



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA**

**TECNOLOGIE BIOMEDICHE IN MEDICINA CLINICA**

**(XXXIII° CICLO)**

**IPOSSIA ED INFIAMMAZIONE NELLA PROGRESSIONE  
DEL CARCINOMA VESCICALE**

**DOTTORANDA Dott.ssa MILENA POLESE**

**TUTOR Prof. ALESSANDRO SCIARRA**

**ANNO ACCADEMICO 2019/2020**

*Ai miei Angeli custodi*

## **Indice/Contenuto**

<b>1- Introduzione</b>	6
1.1- Generalità epidemiologiche, patogenetiche e cliniche su carcinoma vescicale	6
1.2- Eziologia e Patogenesi del carcinoma vescicale	8
1.2.1- Fattori di rischio	8
1.2.2- Storia naturale del carcinoma vescicale: dalla trasformazione alle metastasi.	14
1.3- Ruolo dell'ipossia nella progressione maligna	15
1.4- Caratteristiche della malignità	19
1.4.1- Aumento del potere proliferativo	19
1.4.2 - Ampliamento del compartimento staminale	19
1.4.3 – Ulteriore impulso all'immortalità	20
1.4.4 – Formazione del tessuto tumorale	20
1.4.5 – Ulteriore aumento della sopravvivenza mediata dall'inibizione dell'apoptosi	20
1.4.6 – Alterazioni del metabolismo energetico	20
1.4.7 – Capacità di invasione	23
1.4.8 – Motilità e capacità di migrazione polarizzata	25
1.4.9 - Microambiente e controllo immunitario	30
1.4.10 – Progressione verso la malignità: Risposta biologica integrata	32
<b>2-Scopi della tesi e protocolli sperimentali</b>	33
2.1 – Obiettivi generali	33
2.2 – Protocolli di studio per i singoli obiettivi	33
<b>3-Materiali e Metodi</b>	34
3.1-Arruolamento e studio clinico dei pazienti	34
3.2-Campioni biologici prelevati, storage e analisi	34
3.3-Metodiche di laboratorio	36
3.3.1 – Morfologia	36

3.3.2 – LCMD	36
3.3.3 – Analisi molecolari effettuate sulle frazioni tissutali ottenute con LCMD	37
3.3.4 - Estrazione nucleo/citoplasma	38
3.4- Metodiche di biologia molecolare	39
3.4.1- Elettroforesi e western blotting	40
3.4.2- Estrazione di RNA totale dal tessuto intero e PCR	41
3.4.3- Estrazione delle proteine e WB	42
3.4.5- PCR trascrittomico mediante arrays a bassa densità (cards microfluidiche)	44
3.4.6- Statistica	46
<b>4-Risultati</b>	47
4.1- Morfologia	47
4.2- Espressione di HIF1 $\alpha$ e sua attivazione	47
4.3- Espressione di geni dipendenti da HIF1 $\alpha$	49
4.3.1 - Recettori per le allarmine e VEGFs	49
4.3.2 – Geni proinfiammatori	52
4.3.3 - Geni per l'invasione: Metalloproteasi MMP6, MMP9 – Inibitori metalloproteasi TIMP-2	53
4.3.4 - Recettori di sopravvivenza: ER $\alpha$ , EGFR	53
4.4- Espressione e attivazione di NF $\kappa$ B	53
4.5- Espressione di geni proinfiammatori dipendenti da NF $\kappa$ B	55
4.5.1- Enzimi inducibili: COX2, NOS2	55
4.5.2 - Proteine di fase acuta: PTX3, SAA	56
4.5.3 - Proteine antinfiammatorie: Metalloproteasi MMP9 e proteina antinfiammatoria SOCS-1	57
4.5.4 - Fattori di riparazione: EGFR, ER $\alpha$	58
4.6- Valutazione globale dell'asse HIF/NF $\kappa$ B	59
4.7 - Arrays a bassa densità per 48 geni dipendenti da HIF e da NF $\kappa$ B su cellule staminali di carcinoma vescicale	60
4.8 – Controllo della presenza/assenza di leucociti e cellule CD45+	62

<b>5-Discussione</b>	63
5.1- Formazione del microambiente ipossico	63
5.2- Ruolo dei geni HIF1 $\alpha$ -dipendenti nella progressione	63
5.3- Attivazione di NFkB associata agli effetti dell'ipossia	64
5.4- Ruolo dei geni NFkB-dipendenti nella progressione	64
5.5- Le cellule staminali isolate da carcinoma vescicale rispondono all'ipossia attivando l'asse HIF/NFkB	65
5.6- Valutazione globale dell'asse HIF/NFkB nella progressione maligna: risposta integrata all'ipossia	66
5.7- Implicazioni diagnostiche e prognostiche	66
5.7.1- Biomarcatori diagnostici	67
5.7.2- Biomarcatori prognostici e predittivi di recidiva	68
5.7.3- Quadro immuno-infiammatorio associato alla formazione delle metastasi	68
5.8- Identificazione di possibili bersagli terapeutici	69
5.8.1- Inibitori e modulatori di HIF1 $\alpha$	70
5.8.2- Inibitori e modulatori di NFkB	71
5.8.3- Modulazione della risposta immune e controllo di altri fattori del microambiente	73
<b>6- Conclusioni</b>	74
<b>7- Referenze</b>	76

## 1.-INTRODUZIONE

### 1.1- Generalità epidemiologiche, patogenetiche e cliniche del carcinoma vescicale

Il carcinoma della vescica occupa il nono posto per incidenza tra le neoplasie maligne dell'uomo ed il tredicesimo posto nella mortalità per tumore.

I maschi sono più colpiti delle donne nella proporzione di 3,2/0,9 e l'incidenza, come la maggior parte dei tumori, aumenta con l'età. (Figura 1) [4][28]

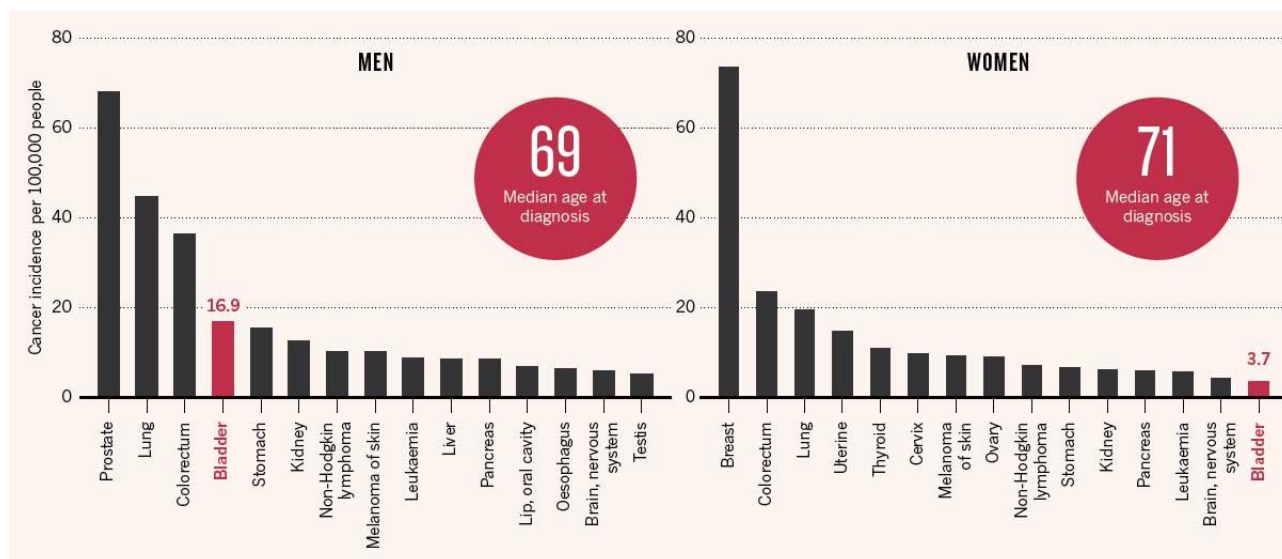
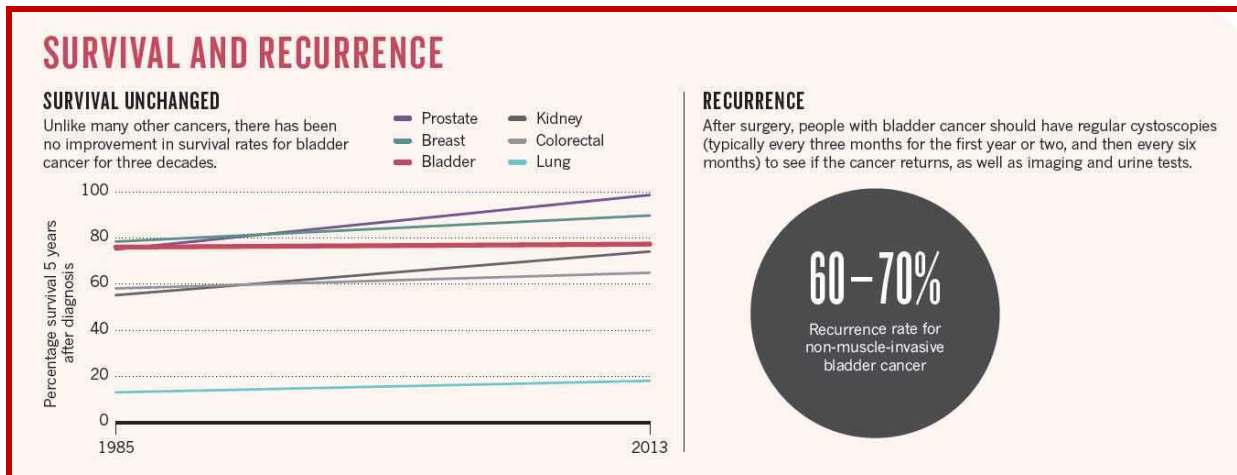


Figura 1– Differente incidenza dei tumori maligni nei maschi rispetto alle femmine [4]

Il sintomo più comune del carcinoma vescicale è l'ematuria macroscopica o microscopica; la prima è presente nel 78% dei pazienti, mentre la seconda si manifesta nel 13,7% dei pazienti. Nonostante questo, l'ematuria viene frequentemente sottovalutata dal medico che non dà seguito a un adeguato approfondimento diagnostico, anche perché per il carcinoma vescicale non vi sono screenings dedicati come esistono invece per altri tumori.

Fino a pochi anni fa sono stati registrati scarsi progressi nella conoscenza e nella terapia del tumore vescicale come è dimostrato dal fatto che sostanzialmente in 30 anni la curva di sopravvivenza a 5 anni non si è modificata (Figura 2). Inoltre, è importante notare che, dopo l'asportazione del carcinoma uroteliale della vescica non muscolo invasivo, il tasso di recidiva si presentava molto alto (60-70%) [4] (Figura 2).



**Figura 2 – Curve di sopravvivenza e recidiva nel carcinoma vescicale [4]**

In questi ultimi anni, tuttavia, il panorama è cambiato e vi sono le premesse per importanti progressi sia nella conoscenza che nella terapia, per un aumento della sopravvivenza o per la guarigione. Per esempio, grazie all'introduzione di nuove strategie terapeutiche (es. farmaci inibitori del checkpoint e varie strategie di immunoterapia) e, soprattutto, grazie alla migliore conoscenza della patogenesi della trasformazione dell'epitelio vescicale (con l'identificazione di numerosi oncogeni e geni oncosoppressori come possibili bersagli terapeutici) e della progressione verso la malignità (ruolo dell'infiammazione cronica e delle alterazioni del microbioma, ruolo delle infezioni) si stanno delineando nuove strategie terapeutiche per un più efficace controllo non solo dell'incidenza ma anche della progressione, per un sostanziale aumento della sopravvivenza.

Attualmente l'uretrocistoscopia (una procedura invasiva per il paziente e costosa per le strutture sanitarie) in associazione all'oncocitologia urinaria su tre campioni, rappresenta il gold standard diagnostico; anche se, di recente, si stanno registrando dei progressi nella evidenziazione di marcatori molecolari urinari che potrebbero definire meglio il grado di progressione verso la malignità, senza invasività per il paziente. Inoltre, come sarà dimostrato in questa tesi, i campioni biologici vescicali ottenuti mediante la procedura endoscopica sono una fonte preziosa di informazioni molecolari, non solo per la diagnosi ma anche per una stadiazione molecolare ed una prognosi più attendibile.

Gli scopi di questa tesi sono: a) evidenziare il ruolo del microambiente ipossico ed infiammatorio nella progressione verso la malignità del tumore della vescica come recentemente definito in molti tumori umani; b) riassumere gli ultimi progressi sulla conoscenza della neoplasia vescicale; c) presentare possibili marcatori diagnostici e prognostici, per facilitare la diagnosi precoce e per prevenire le recidive dopo TURB (Resezione Trans-Uretrale della Vescica); infine, d) suggerire nuove strategie terapeutiche per bloccare/rallentare la progressione del carcinoma vescicale mediante la modulazione negativa dell'adattamento all'ipossia e dell'attività infiammatoria cronica.

## 1.2-Eziologia e Patogenesi del carcinoma vescicale

### 1.2.1-Fattori di rischio

I fattori di rischio del carcinoma della vescica sono comuni ad altri tumori maligni solidi, come il tumore della prostata, del polmone, della mammella e dei tumori testa/collo. Solo alcuni fattori hanno un grado di specificità di tessuto.

Si distinguono fattori esogeni (fumo, stili di vita, vivere in aree urbane e/o inquinate, dieta povera di frutta, verdura e di cibi freschi, fattori occupazionali e ambienti di lavoro inquinati, infezioni e parassitosi, ecc.) [4] (Figura 3) e fattori endogeni (associazione con diverse condizioni patologiche, specialmente di carattere infiammatorio cronico oppure di natura endocrina ed un substrato genetico con mutazioni e polimorfismi che favoriscono la nascita del tumore).



**Figura 3 – Principali agenti esogeni coinvolti nella patogenesi del carcinoma vescicale [4]**

- a) Il fumo di sigaretta è il fattore di rischio più comune e si ritiene responsabile di oltre la metà dei casi. Tuttavia, tra l'esposizione al fumo e la diagnosi clinica decorrono almeno 20 anni, rendendo più difficile per il paziente avvertire questa stretta associazione. Nel fumo del tabacco carbonizzato (sigaretta) sono contenuti anche precursori precancerogeni, come le amine aromatiche, che a livello vescicale vengono attivati in cancerogeni da una  $\alpha$ -glucuronidasi vescicale. Pertanto, è necessario che i fumatori siano coscienti della necessità di un attento monitoraggio preventivo anche per il carcinoma vescicale, oltre che per quello polmonare. Al fumo si correla anche la maggiore incidenza che si osservava fino a qualche anno fa nei paesi più sviluppati, per esempio, dell'Europa occidentale, come Spagna e Italia. Parallelamente alle recenti politiche fortemente mirate a disincentivare il fumo, l'incidenza del carcinoma vescicale è diminuita, soprattutto nei maschi, mentre nelle donne tale dato è meno evidente per il progressivo aumento delle fumatrici. Purtroppo, nello stesso periodo l'aumento dei fumatori nei paesi meno sviluppati (Africa, Sud-Est asiatico, Cina e nazioni dell'Est europeo) ha fatto aumentare sostanzialmente l'incidenza di tale patologia.
- b) Altri fattori esogeni comprendono lo stile di vita, come la dieta povera di frutta e vegetali, abitare in aree inquinate e urbane, il contatto e l'utilizzo di acque contaminate da arsenico, ambienti rurali



infestati da parassiti e, infine, alcune occupazioni lavorative. Tra queste ultime vanno ricordate le industrie dei coloranti che usano le aniline; queste sostanze sono precursori di cancerogeni che a livello vescicale, per la presenza di alcuni complessi enzimatici, vengono attivate in cancerogeni attivi capaci di indurre mutazioni nel DNA.

- c) Il tumore della vescica si associa anche a fattori endogeni (fattori endocrini come gli androgeni) e ad altre patologie come infezioni, infiammazione cronica, obesità e malattia metabolica.

È nota e storicamente accertata (in papiri del 1500 a.C.) la schistosomiasi vescicale da *Schistosoma haematobium* (o bilharziosi) tipicamente prevalente in Egitto, dove il parassita vive nelle acque del fiume Nilo e contamina le acque urbane attraverso i prodotti dell'agricoltura ed i liquidi biologici provenienti da pazienti infetti. Il parassita si riproduce nella parete della vescica provocando una forte infiammazione cronica e danni alla mucosa con abbondante ematuria. Addirittura, nel 1800 un medico francese descrisse tale patologia, affermando che l'Egitto era il solo paese al mondo dove anche gli uomini avevano le perdite mestruali. Il dato fondamentale della schistosomiasi vescicale è la persistenza di una forte infiammazione cronica della mucosa vescicale che determina un potente stimolo cancerogeno, sia per la fase di trasformazione (liberazione di radicali liberi mutageni e un continuo stimolo proliferativo per la riparazione della parete), sia per la fase di progressione dei piccoli tumori iniziali con l'adattamento all'ipossia ed attivazione di NFκB. I dati storici riportano che in Egitto, nel 1920, il carcinoma vescicale era il primo dei tumori maligni per frequenza con il 70% degli Egiziani affetti da infezione da schistosoma. Forti azioni sanitarie di prevenzione e l'uso del farmaco Praziquantel (efficace contro lo schistosoma) hanno ridotto drasticamente l'infezione al 7% e, di conseguenza, anche l'incidenza del carcinoma vescicale uroteliale. Purtroppo, recentemente, il forte aumento dell'abitudine al tabagismo, insieme all'industrializzazione e all'inquinamento urbano, hanno dato un nuovo impulso alla crescita dell'incidenza del tumore, seppure di diverso istotipo (carcinoma vescicale squamoso. [46].

- HPV o Human Papilloma Virus. È stata evidenziata anche l'associazione della trasformazione tumorale dell'epitelio vescicale ad infezioni vescicali persistenti da HPV. È noto che questo virus è capace di inattivare mediante alcune sue proteine (E6/E7) la p53, il più frequente gene oncosoppressore, con perdita di funzione nei tumori umani. L'inattivazione della p53 da parte di E6/E7 avviene solo nel caso SNP (polimorfismo da singolo nucleotide) in cui la prolina in posizione 72 viene sostituita da arginina, acquistando la capacità di formare il legame inattivante con la proteina virale [3].

- La malattia metabolica e l'obesità costituiscono un rischio indipendente per il carcinoma vescicale squamoso anche se non se ne conoscono esattamente i meccanismi [9]. È probabile che

l'infiammazione cronica di basso grado, notoriamente presente in queste condizioni, costituisca il fattore di rischio aggiuntivo anche per il tumore della vescica.

- La netta differenza di incidenza tra maschi e femmine, pur depurata dagli altri fattori di rischio (fumo, stile di vita, ambiente, ecc.), ha suggerito che esiste un ruolo degli androgeni nella patogenesi della patologia vescicale. I recettori androgenici sono abbondanti in tutta l'area urogenitale con funzioni di mantenimento dei tessuti attraverso la proliferazione e la differenziazione distrettuale. Questo suggerisce il contributo alla genesi del tumore come promotori della crescita di cellule già trasformate ed eventuale blocco della differenziazione in caso di perdita di funzione [44] [25].

- Come per tutti i tumori, l'età avanzata costituisce un rischio aggiuntivo per tutti i tumori, incluso quello vescicale, per due motivi principali: a) la progressiva inefficienza dei meccanismi di riparazione del DNA e la cumulativa esposizione al rischio cancerogeno ambientale hanno favorito l'accumulo di mutazioni che portano alla trasformazione; b) caratteristica dell'età avanzata è la costante presenza di un'infiammazione di basso grado che, oltre all'azione mutagena dei radicali prodotti nella flogosi, insieme con l'ipossia rappresenta uno dei due fattori scatenanti la progressione verso la malignità.

- Negli ultimi anni è stato evidenziato il ruolo del microbioma vescicale nel trofismo dell'epitelio vescicale [2]. È stato anche dimostrato che l'alterazione del microbioma rappresenta un importante fattore di rischio per il carcinoma vescicale, attraverso processi infiammatori cronici di basso grado persistenti nel tempo. All'origine delle alterazioni del microbioma vescicale vi possono essere anche cause iatrogene, soprattutto l'uso improprio, prolungato e non specifico di antibiotici ed antisettici urinari [2].

d) Base genetica: i notevoli progressi dell'Oncologia molecolare e delle tecniche massive di sequenziamento del genoma (Next Generation Sequencing) hanno permesso di individuare la maggior parte delle migliaia di mutazioni dei numerosi geni coinvolti nella genesi del carcinoma vescicale.

Una prima distinzione è tra le mutazioni acquisite nel corso della vita e quelle ereditate dai genitori attraverso le cellule germinali. Le prime sono causate dai fattori esogeni/endogeni di cui si è parlato sopra, le seconde sono quelle che si riscontrano nei clusters familiari di predisposizione ai tumori della vescica e/o di altri tumori (sindromi tumorali familiari e nella maggior parte dei tumori pediatrici e giovanili) e riguardano specifici geni ampiamente descritti in letteratura [12].

Una seconda distinzione si basa sull'effetto funzionale della mutazione. Quando la mutazione oncogena porta ad un guadagno di funzione della/e molecole codificate si parla di oncogeni [45] (TABELLA 1). Per gli oncogeni la mutazione è funzionalmente dominante. Se invece la mutazione oncogena provoca una perdita o assenza di funzione del prodotto codificato si parla di geni oncosoppressori [45] (TABELLA 2). In questi casi la mutazione si comporta da carattere recessivo e,

pertanto, il potenziale oncogeno si esplica in condizioni di omozigosi, quando anche la seconda copia del gene subisce una mutazione inattivante.

Oncogenes activated by mutation in bladder cancer				
Gene	Chromosome	Frequency (%)	Alteration	Refs
<i>Low-grade stage Ta tumours</i>				
TERT	5p15	73–83	Point mutation	224,225
FGFR3	4p16	• 60–70 • 80*	• Point mutation • Upregulated expression	68,84
PIK3CA	3q26	16–25	Point mutation	73,75
HRAS	11p15	~10	Point mutation	62,72
KRAS	12p12	5	Point mutation	72
MDM2	12q14–q15	3	Amplification	226
AKT1	14q32	1–3	Point mutation	82
<i>Muscle-invasive tumours</i>				
E2F3	6p22	20	Gain or amplification	10
PIK3CA	3q26	9–20	Point mutation	73,75
FGFR3	4p16	• 5–20 • 40*	• Point mutation • Upregulated expression	68,84
MDM2	12q14–q15	5–15	Amplification	64,226
HRAS	11p15	5–12	Point mutation	10,227
ERBB3	12q13	11	Point mutation	10
CCND1	11q13	10	Amplification	10
RXRA	9q34	9	Mutation	10
HER2 (ERBB2)	17q12	• 7 • 4.5 • 42*	• Gain or amplification • Mutation • Amplification	10,98
EGFR	7p12	6	Gain or amplification	10
FGFR1	8p12	6	Amplification	228
KRAS	12p12	6	Point mutation	227
AKT1	14q32	1–3	Point mutation	82

Altered expression is listed for selected genes. \*In the micropapillary variant. \*Change measured in the corresponding protein.

**TABELLA 1 – Oncogeni identificati nel carcinoma vescicale, attivati da diverse mutazioni e la loro frequenza [45]**

Infine, una terza distinzione può essere fatta su base del meccanismo a seconda della via metabolica/biologica colpita dalla mutazione. La maggior parte degli oncogeni e dei geni oncosoppressori mutati identificati sono responsabili della trasformazione, ossia della prima tappa della cancerogenesi e riguardano tre grandi classi di geni: a) Geni dei meccanismi di riparazione del DNA e dei cromosomi che portano all'instabilità genetica responsabile dell'accumulo delle mutazioni per la trasformazione. La maggior parte sono geni oncosoppressori; b) Geni per il controllo della proliferazione cellulare che comprendono numerosi oncogeni che stimolano la proliferazione

attraverso vari meccanismi (TABELLA 1) e numerosi geni oncosoppressori che inibiscono o bloccano la proliferazione a diversi livelli del ciclo cellulare, attraverso complesse vie metaboliche (TABELLA 2). Pertanto, l'attivazione di questi oncogeni e/o l'inattivazione di questi geni oncosoppressori porta a un aumento sostanziale della massa cellulare in un tessuto; c) Infine, geni coinvolti nel controllo dell'apoptosi. La morte cellulare programmata è il principale meccanismo, insieme con la regolazione del ciclo cellulare, per il mantenimento del numero delle cellule in un tessuto/organo. Vi sono geni che inibiscono l'apoptosi o geni antiapoptosici che con mutazioni attivanti si comportano da oncogeni e geni che favoriscono l'apoptosi o geni proapoptosici che in seguito a mutazioni inattivanti si comportano da geni oncosoppressori. Pertanto, l'inattivazione di questi ultimi e/o l'attivazione di quelli antiapoptosici contribuiscono in maniera sostanziale all'aumento della massa cellulare e alla crescita iniziale del tumore.

In conclusione, per la fase di trasformazione, così da ottenere il tumore iniziale (di piccole dimensioni, non superiore a 200-330 micron e non ancora con le tipiche proprietà della malignità), è necessaria la mutazione di pochi (a volte solo due) geni appartenenti alle classi funzionali sopra elencate.

Tumour suppressor genes inactivated by mutation in bladder cancer

Gene	Chromosome	Frequency (%)	Alteration	Refs
<b>Low-grade stage Ta tumours*</b>				
CDKN2A	9p21	• 50–60 • 18 • 15	• Loss of heterozygosity • Hemizygous deletion • Homozygous deletion	112,229
KDM6A	Xp11	12–60	Inactivating mutation	62,63
STAG2	Xq25	32–36	Inactivating mutation	77,78
ELF3	1q32	20–25	Inactivating mutation	62,63
ARID1A	1p35	12–35	Inactivating mutation	62,63
EP300	22q13	12–25	Inactivating mutation	62,63
KMT2D	12q13	15–24	Inactivating mutation	62,63
TP53	17p13	6–20	Inactivating mutation	76,230
RBM10	Xp11	20	Inactivating mutation	62
CREBBP	16p13	16–20	Inactivating mutation	62,227
ERCC2	19q13	20	Inactivating mutation	62,227
ATM	11q22–23	5–15	Inactivating mutation	62,63
TSC1	9q34	~12	Inactivating mutation	73,76
RB1	13q14	~5	Inactivating mutation	62,63
<b>Muscle-invasive tumours</b>				
ARID1A	1p35	25	Inactivating mutation	10
TXNIP	1q21	7	Inactivating mutation	10
ELF3	1q32	8	Inactivating mutation	10
NFE2L2	2q31	8	Inactivating mutation	10
FBXW7	4q31	10	Inactivating mutation	10
APC	5q21–q22	6–16	Inactivating mutation	76,91
CDKN1A	6p21	14	Inactivating mutation	10
EP300	22q13	15	Inactivating mutation	10
CDKN2A	9p21	• 50–60 • 28 • 22	• Loss of heterozygosity • Hemizygous deletion • Homozygous deletion	112,229
TSC1	9q34	8–12	Inactivating mutation	10,73,76
PTEN	10q23	• 13–58 • 17 • 1–6	• Loss of heterozygosity or hemizygous deletion • Mutation • Homozygous deletion	10,73, 81,231
ATM	11q22–23	14	Inactivating mutation	10
KMT2D	12q13	27	Inactivating mutation	10
MDM2	12q14–q15	4–9	Gain or amplification	10,232
RB1	13q14	13	Inactivating mutation	10
KLF5	13q22	8	Inactivating mutation	10
TSC2	16p13	2	Inactivating mutation	76

\*Frequencies of inactivating mutations identified by exome sequencing in Ta tumours are derived from studies of much smaller numbers of tumours than those of muscle-invasive bladder cancer. For Ta tumours, only mutations reported in more than one study are listed.

TABELLA 2 – Geni oncosoppressori mutati con perdita di funzione nel carcinoma vescicale [45]

### 1.2.2-Storia naturale del carcinoma vescicale: dalla trasformazione alle metastasi (Figura 4).

Il carcinoma vescicale origina dall'epitelio stratificato che ricopre la superficie interna della vescica (o urotelio). Ma quali siano le cellule coinvolte di questo tessuto complesso a diversa differenziazione è ancora incerto. Oggi si pensa che la primitiva trasformazione neoplastica si verifichi nel compartimento delle cellule staminali, che risiedono principalmente nello strato basale e meno ossigenato dell'epitelio. La cellula staminale va incontro a trasformazione tumorale avendo accumulato mutazioni di geni coinvolti nel controllo della proliferazione e dell'apoptosi. In questo modo la cellula mutata dà luogo al tumore iniziale, in assenza di angiogenesi. Questo suggerisce l'origine monoclonale del singolo tumore primitivo. Ciò non toglie che nello stesso tempo altre cellule staminali possano andare incontro a trasformazione in altre regioni dell'epitelio, dando luogo a tumori multipli nello stesso tessuto (origine policlonale), i quali non necessariamente presentano le stesse mutazioni, pur con risultati simili sul controllo della crescita e dell'apoptosi. Tipicamente questi piccoli tumori iniziali risultano "relativamente benigni", non avendo ancora acquisito nessuna delle tipiche caratteristiche della malignità; crescono nell'ambito del tessuto (epitelio) senza oltrepassare i confini biologici dello stesso (ossia la membrana basale) e per questo vengono definiti tumori non muscolo invasivi. Rientrano in questa categoria i carcinomi vescicali in situ (Tis); i tumori papillari non invasivi (Ta) la cui crescita avviene all'interno del lume vescicale senza invadere i componenti sottostanti la membrana basale ed il grado T1 che invade la lamina propria (Figura 4). La successiva crescita, associata a progressione maligna, dà luogo a tumori invasivi che potenzialmente possono dare metastasi di vario grado a seconda delle strutture invase: il grado T2 indica l'invasione della parete muscolare (T2a a livello superficiale e T2b a livello profondo); il grado T3 infiltra il tessuto perivescicale (T3a microscopicamente e T3b macroscopicamente); il grado T4a coinvolge la prostata, le vescicole seminali, l'utero o la vagina mentre il grado T4b invade la parete pelvica o la parete addominale. I tumori dal T2 al T4 vengono classificati come muscolo-invasivi [45] (Figura 4) (TABELLA 8)

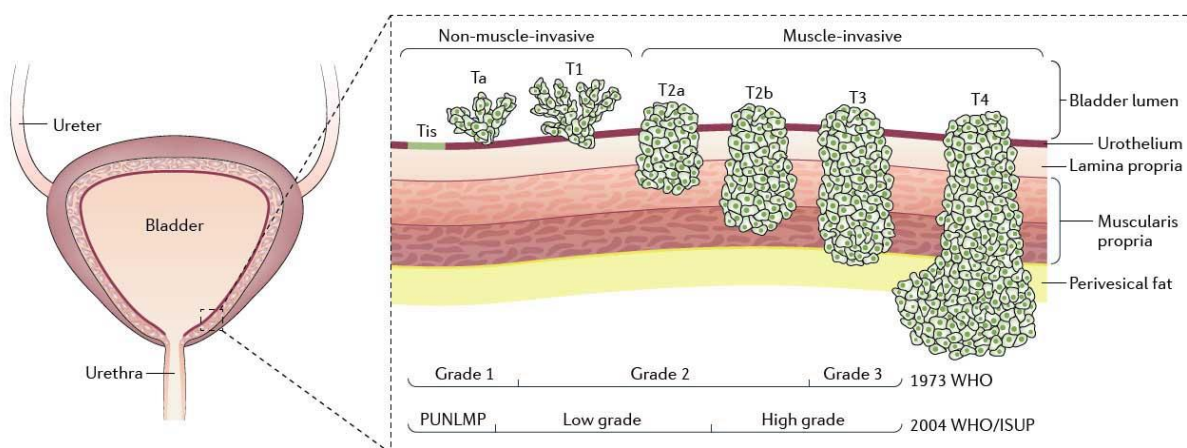
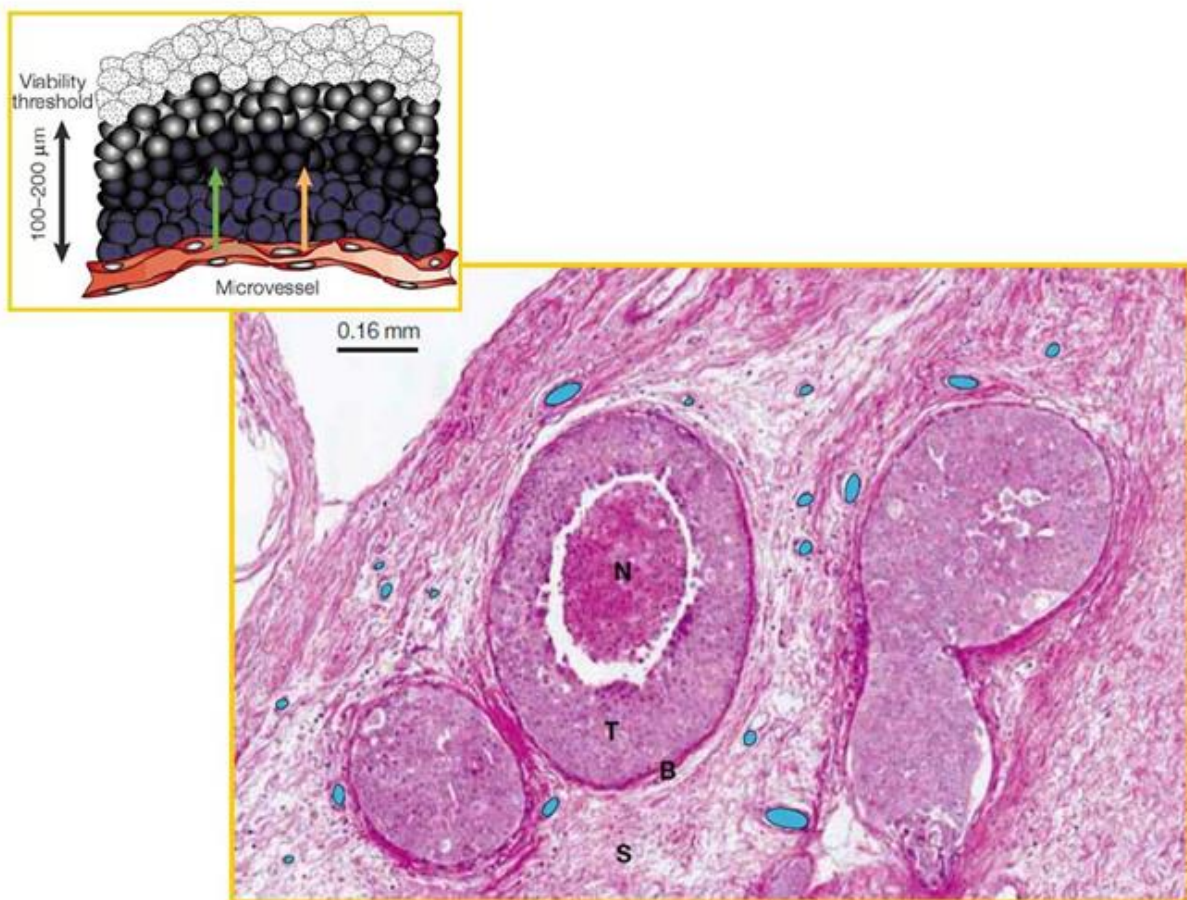


Figura 4 – Storia naturale del tumore vescicale: stadiazione [45]

### 1.3-Ruolo dell'ipossia nella progressione maligna

La crescita del tumore iniziale oltre le capacità di diffusione dell'ossigeno dai vasi (200-250  $\mu\text{m}$ ) produce un microambiente ipossico (Figura 5) e, successivamente, innesca un processo infiammatorio riparativo; queste due condizioni permettono alle cellule trasformate di acquisire tutte le proprietà della malignità e, in particolare, la capacità invasiva e di migrazione. Il tumore invade progressivamente i tessuti sottostanti, superando la membrana basale, la lamina propria dello strato muscolare, il grasso perivescicale e, infine il peritoneo (Figura 4). Questi sono i tumori di basso e alto grado che culminano nell'acquisizione della capacità di dare metastasi.



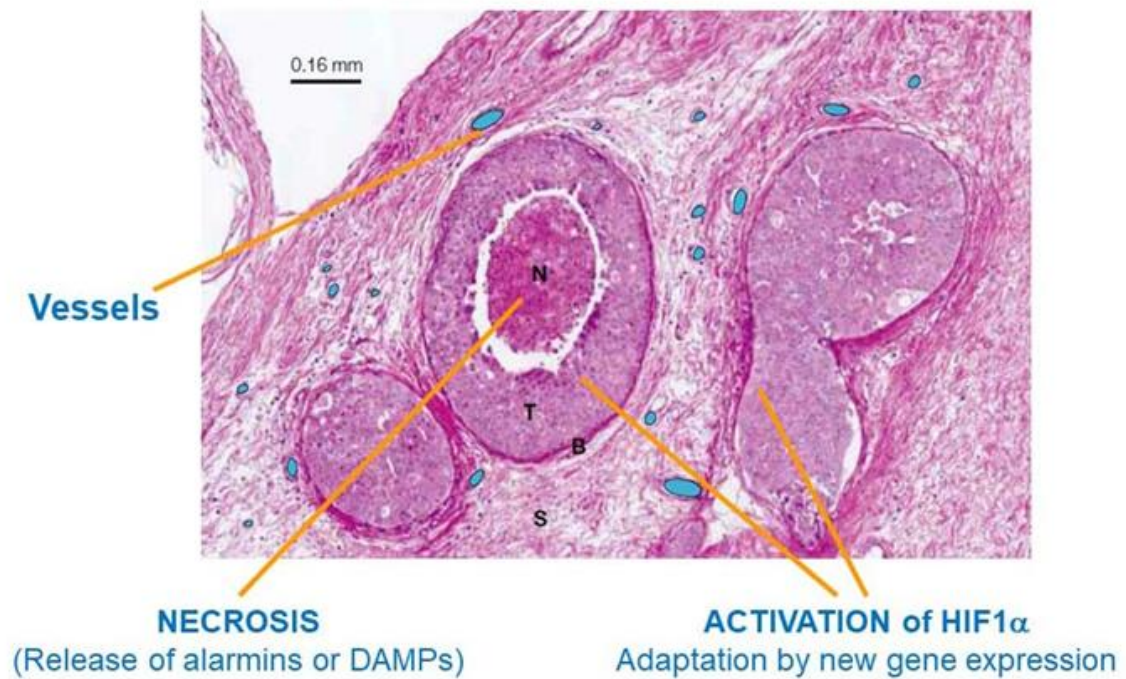
**Figura 5 – Crescita del tumore iniziale in assenza di neoangiogenesi e formazione del microambiente ipossico, ingravescente in ragione della distanza dai vasi. N=necrosi. In azzurro i vasi sanguigni.**

Questo avviene per adattamento all'ipossia. Le cellule trasformate crescono inizialmente per formare piccoli tumori in assenza di neoangiogenesi (Figura 5). Quando il diametro del tumore iniziale raggiunge il diametro di 300-400  $\mu\text{m}$ , al suo centro, lontano dai vasi del tessuto ospite, si stabilisce un microambiente ipossico con

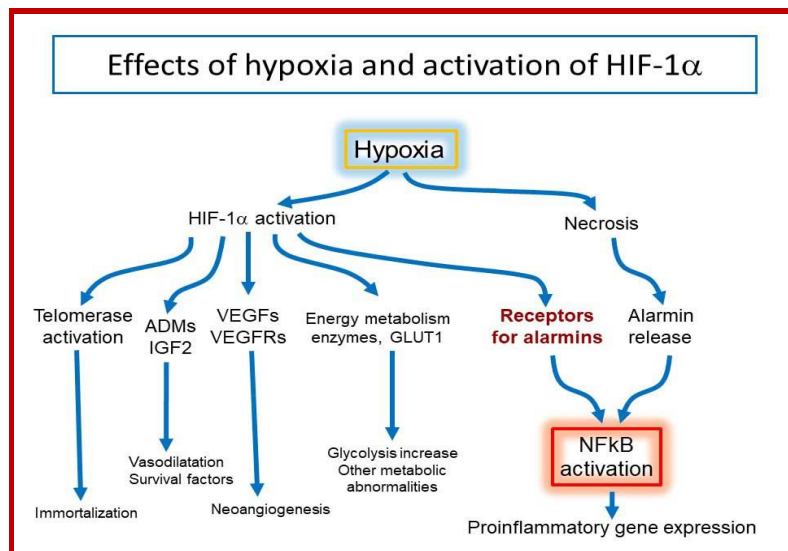
l'attivazione di un importante fattore di trascrizione, l'HIF o Fattore Inducibile dall'Ipossia, dal quale dipende l'espressione di centinaia di geni finalizzati all'adattamento all'ipossia, alla sopravvivenza delle cellule interessate ed alla riparazione di eventuali danni (Figure 6 e 7). Questa fase di adattamento, ampiamente studiata per le profonde modificazioni che avvengono nella cellula trasformata, è anche conosciuta come "transizione epitelio-mesenchimale" in cui è evidenziabile l'acquisizione delle diverse proprietà tipiche dalla malignità.

L'ipossia ha importanti conseguenze nelle cellule che resistono alla diminuzione dell'ossigeno; infatti, con l'attivazione di HIF1 $\alpha$ , si ha l'espressione di tutti quei geni che con varie funzioni contribuiscono alla progressione maligna (Figura 7). Tra quelli più importanti, vi sono i fattori per la neoangiogenesi (VEGFs ed i loro recettori) che permettono al piccolo tumore iniziale di crescere oltre i 400  $\mu$ m ed i recettori per le allarmine (come RAGE, P2X7, vari TLRs, ecc.) che stimolati dalle allarmine stesse permettono la piena attivazione dell'asse HIF/NF $\kappa$ B e la completa progressione verso la malignità. Le allarmine sono riconosciute come segnali di danno (o DAMPs [Damage Associated Molecular Patterns], come HMGB1, ATP/ADP, ac. nucleici, frammenti di membrana con fosfatidil-serina, ecc.) che vengono rilasciati dalle cellule danneggiate più distanti dai vasi, che non hanno resistito all'ipossia e sono andate incontro a morte (necrosi o apoptosi). Le allarmine stimolano i recettori indotti da HIF1 $\alpha$ , attivando un forte pathway infiammatorio-riparativo controllato da NF $\kappa$ B. I geni trascritti sotto il controllo di NF $\kappa$ B forniscono un ulteriore contributo alla transizione epitelio-mesenchimale e quindi alla progressione maligna.



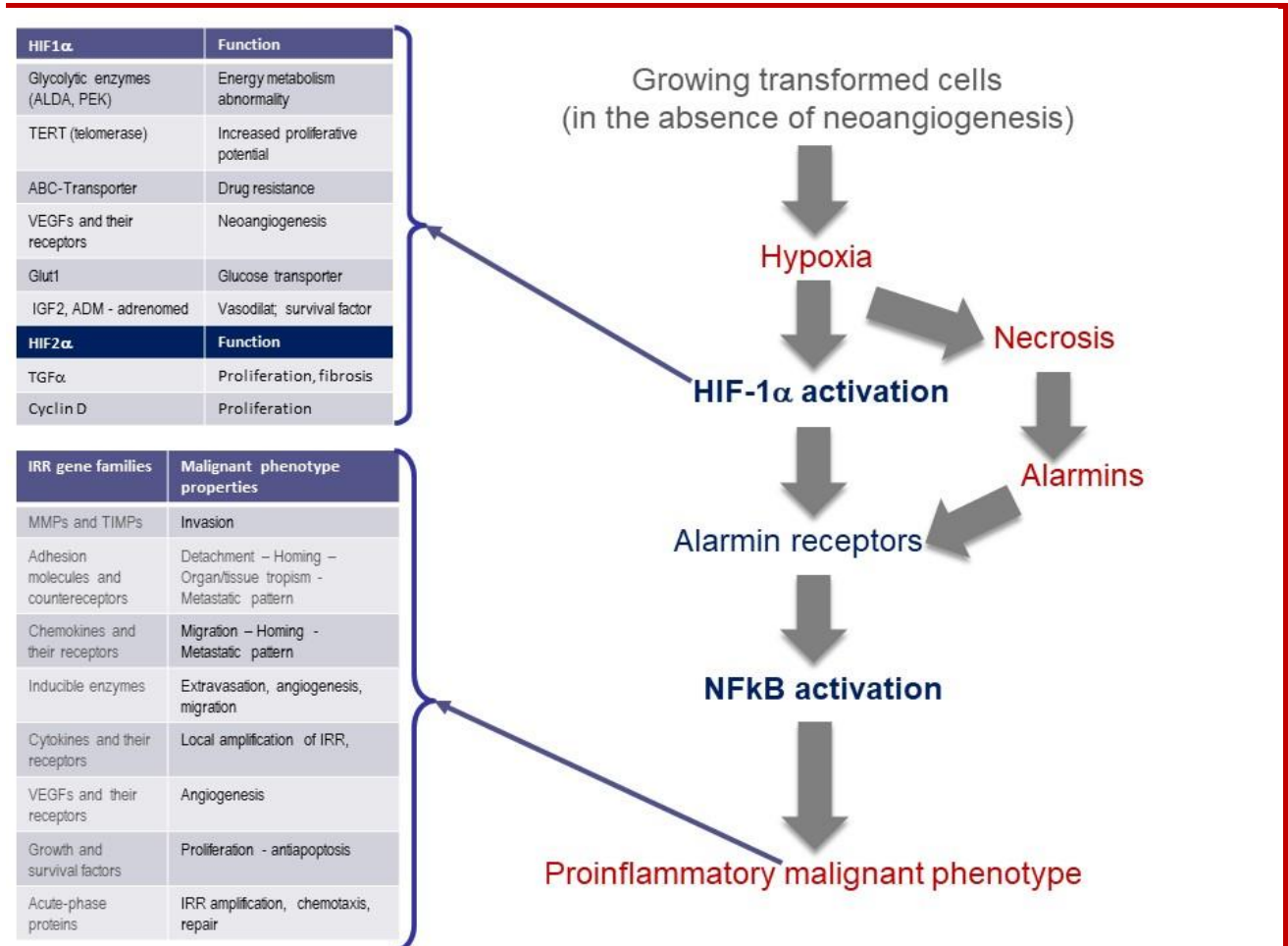


**Figura 6 – Principali conseguenze dell’ipossia: necrosi lontano dai vasi e adattamento da attivazione di HIF1α delle cellule più distanti dai vasi.**



**Figura 7 – Adattamento genico all’ipossia, dopo attivazione di HIF1α.**

Esaminando le diverse famiglie dei geni dipendenti dall'asse HIF/NFkB (Figura 8) e la loro funzione biologica, si evidenzia che con l'attivazione di questo asse metabolico si ha una risposta integrata della cellula trasformata e del microambiente tumorale che spiega la nascita del fenotipo maligno con tutte le proprietà di capacità invasiva, migratoria, di homing, di metastasi a distanza ed indipendenza della crescita (Figura 8).



**Figura 8 – Trascrittoma parziale dell'asse HIF/NFkB i cui geni spiegano le diverse proprietà del fenotipo maligno acquisito nel corso della progressione innescata dall'ipossia.**

## 1.4-Caratteristiche della malignità e geni dipendenti dall'asse HIF/NFkB

L'esame accurato del trascrittoma (pattern dei geni trascritti) grazie all'attivazione dell'asse HIF/NFkB (Figura 8) mostra il coinvolgimento di centinaia di geni alla cui funzione in varia maniera possono essere specificamente correlate le Hallmarks descritte da Hannhan e Weinberg [20] (Figura 9).

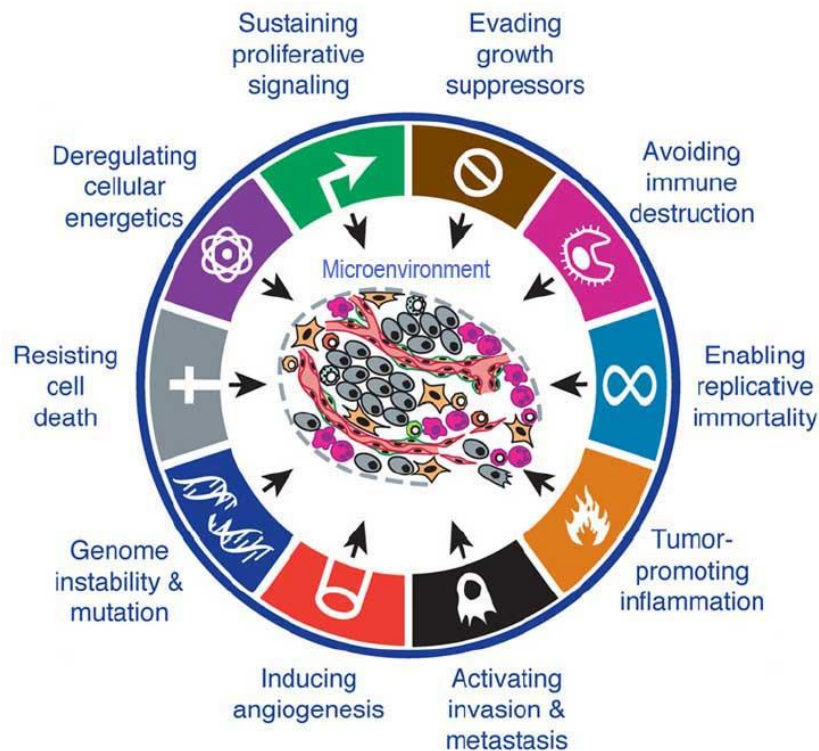


Figura 9 – Caratteristiche del fenotipo maligno secondo Hannhan e Weinberg [21]

### 1.4.1-Aumento del potere proliferativo

L'attivazione di HIF1 $\alpha$  produce una sovraespressione sostanziale di c-MYC e ciclina-D1 due oncogeni spesso attivati nelle cellule trasformate con la perdita del controllo della proliferazione. Perciò l'aumentata sintesi di queste due proteine nella fase di progressione dà un ulteriore vantaggio proliferativo al tumore iniziale [53].

### 1.4.2-Ampliamento del compartimento staminale.

È interessante notare che HIF1 $\alpha$  controlla l'espressione di cruciali geni della staminalità e della riprogrammazione, come SOX2, OCT4, FKL-4, NOTCH, TERT. Pertanto, il compartimento delle cellule staminali del tumore viene mantenuto e ampliato, grazie all'attivazione/sovraespressione, anzitutto, della telomerasi e, possibilmente, anche alla riprogrammazione di cellule tumorali già differenziate che possono

ritornare allo stato staminale, sotto l'azione di geni essenziali della staminalità (c-MYC, SOX-2, OCT-4, FLK-4) identificati da Yamanaka.

#### **1.4.3- Ulteriore impulso all'immortalità.**

HIF1 $\alpha$  è responsabile di una sostanziale sovraespressione di TERT. Questo gene codifica la telomerasi per il mantenimento e l'allungamento dei telomeri e questo rappresenta un ulteriore contributo all'immortalità delle cellule trasformate [41].

#### **1.4.4-Formazione del tessuto tumorale.**

La crescita del tumore oltre i 400  $\mu\text{m}$  di diametro porta alla formazione del tessuto tumorale. Nonostante l'attiva ed autonoma proliferazione, il tumore iniziale, in assenza di neoangiogenesi, non riesce a superare il diametro di 350-400  $\mu\text{m}$  a causa della necrosi delle cellule distanti dal rifornimento di ossigeno e substrati forniti dai vasi sanguigni. Nelle cellule che sopravvivono, l'ipossia attiva i fattori di trascrizione HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  e HIF3 $\alpha$ . In condizioni di ipossia si modifica lo stato redox del citosol per la formazione di grandi quantità di radicali e questo attiva sia HIF1 $\alpha$  che NF $\kappa$ B [22][53]. HIF1 $\alpha$  trascrive i geni per la neoangiogenesi e in particolare VEGFs ed i loro recettori che forniscono al tumore un sistema vascolare con una perfusione che supera i limiti imposti dalla diffusione per gradiente (200  $\mu\text{m}$ ) [41]. L'aumento della massa tumorale può essere causa di importanti segni clinici legati ai fenomeni compressivi generati su strutture adiacenti/vicine e, quindi, ai sintomi che così vengono diventano clinicamente rilevabili.

È interessante notare che parallelamente HIF1 $\alpha$  attiva anche altri fattori di crescita, come TGF- $\beta$ , FGFs e i loro recettori, oltre geni di varie proteine della matrice extracellulare, permettendo così la formazione dello scaffold stromale e, in definitiva, del tessuto tumorale capace di conservare in parte l'architettura e la differenziazione (grazie alle influenze del microambiente) del tessuto di origine [35].

#### **1.4.5-Ulteriore aumento della sopravvivenza mediata dall'inibizione dell'apoptosi.**

HIF1 $\alpha$  attiva la trascrizione di numerosi fattori di sopravvivenza antiapoptotici, come le adrenomedulline e l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor). Questo dà un ulteriore contributo all'aumento della massa tumorale, soprattutto attraverso l'inibizione dell'apoptosi, un meccanismo che può essere già presente nelle cellule trasformate, sostenuto da oncogeni antiapoptotici mutati [53][56].

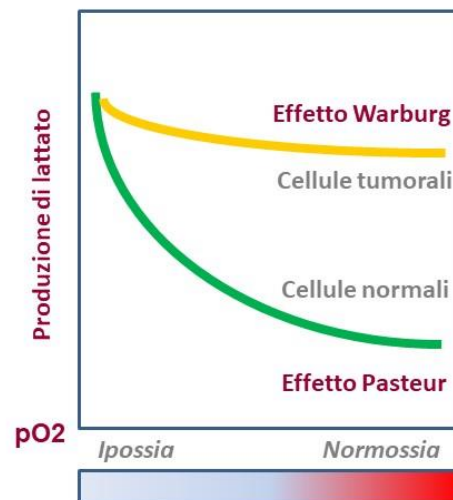
#### **1.4.6- Alterazioni del metabolismo energetico.**

È noto che una caratteristica metabolica dei tumori maligni è l'alta glicolisi, nonostante la presenza ottimale di ossigeno (effetto Warburg). In genere, in presenza di normale pO<sub>2</sub>, la glicolisi è bassa e l'acido lattico viene trasformato rapidamente in acido piruvico e avviato al ciclo di Krebs. Solo in condizioni di ipossia si ha abbondante produzione di acido lattico con blocco/rallentamento della sua trasformazione in acido piruvico e, quindi, acidificazione del citoplasma; tale processo è detto "effetto Pasteur". Questo effetto non è presente nei tumori progrediti, nei quali, pur in presenza di pO<sub>2</sub> ottimale vi è sempre alta glicolisi con produzione di acido

lattico, costante acidificazione del citoplasma e secrezione di protoni con acidificazione del microambiente tumorale; questo è detto “effetto Warburg” (Figura 10). Da notare che le cellule del tessuto ospite possono andare incontro, come reazione alla necessità di smaltire i protoni in eccesso, a modificazioni del fenotipo, aumentando il contenuto di mitocondri (oncociti) e diventando simili alle cellule ossifile o oxintiche dei vari tessuti (tiroide, mucosa dello stomaco, epitelio del tubulo renale, ecc.).

## Effetto Pasteur ed Effetto Warburg

- **Effetto Pasteur:** normalmente in presenza di  $O_2$  non si ha produzione di acido lattico (non è attiva la glicolisi)
- **Effetto Warburg:** nelle cellule tumorali in presenza di  $O_2$  vi è alta produzione di acido lattico (alta glicolisi)
- **Vari contributi all'effetto Warburg:**
  - Mutazioni (oncogeni o geni oncosoppressori)
  - Effetto di oncogeni o geni oncosoppressori su enzimi chiave del metabolismo
  - Effetto dell'ipossia con rimodellamento genico a attivazione di IRR



**Figura 10 – Effetto Pasteur ed Effetto Warburg.**

Queste modificazioni possono presentarsi in alcuni tumori già nella fase di trasformazione per due ragioni:

a) alcuni enzimi del metabolismo energetico possono andare incontro a mutazioni (oncogeni o geni oncosoppressori), come dimostrato per la succinato-deidrogenasi, la fumarasi e le due isocitrato-deidrogenasi, anche nel carcinoma vescicale (TABELLA 3). b) alcuni enzimi-chiave del metabolismo energetico (es. lattato-deidrogenasi) possono essere impropriamente attivati da prodotti oncogenici dotati di attività tirosin-chinasica (come c-myc, src, e altri), mantenendo così alta la produzione di acido lattico (TABELLA 4).

## Enzimi del metabolismo energetico mutati come oncogeni o geni oncosoppressori

Enzima	Tumore
Succinato-deidrogenasi	Paraganglioma, ca vescicale
Fumarasi	Leiomioma, leiomiosarcoma
Isocitrato-deidrogenasi 1	Glioblastoma, astrocitoma
Isocitrato-deidrogenasi 2	Astrocitoma, ca vescicale
<i>NEJM, 2009, 360:790-800 and 813-815</i>	

*Sono tutti parte del Ciclo di Krebs  
e hanno sede nella matrice mitocondriale*

**TABELLA 3 – Enzimi del metabolismo energetico mutati nei tumori maligni.**

## Enzimi-chiave della glicolisi come bersaglio di oncogeni o geni oncosoppressori

Enzima	Bersaglio di
Esochinasi	Src e altre tirosin-chinasi K-ras Overespresso da myc, jun, ecc.
Fosfofruttochinasi	Src e altre tirosin-chinasi Perdita di funzione fosfatasi (pten)
Piruvatochinasi	Src e altre tirosin-chinasi
Altri enzimi (???)	Guadagno di funzione tirosinchinasi Perdita di funzione fosfatasi

**TABELLA 4 – Enzimi come bersaglio di oncogeni o geni oncosoppressori.**

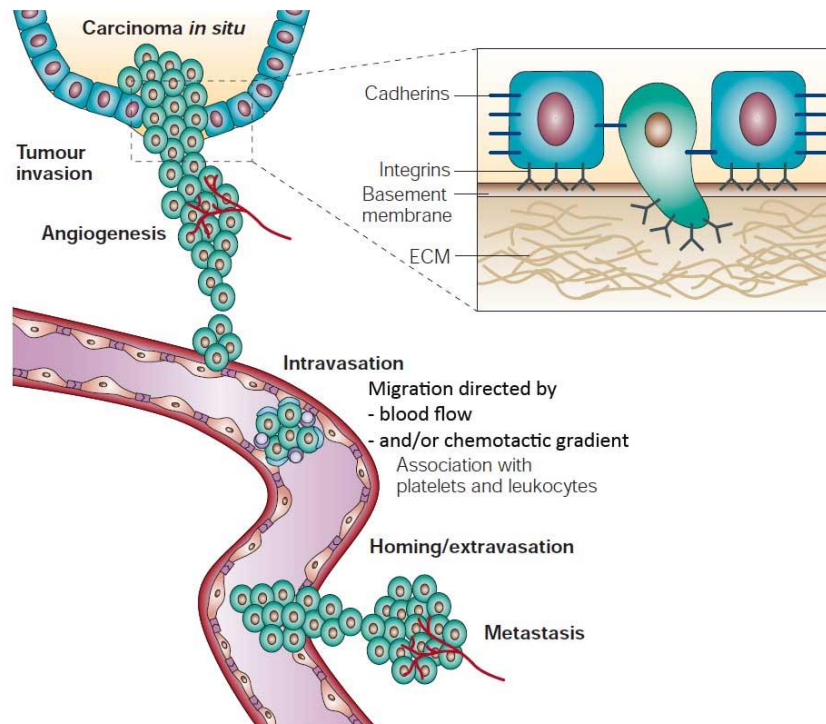
Tuttavia, queste modificazioni metaboliche sono più evidenti nei tumori maligni progrediti, dopo attivazione dell'asse HIF/NFκB. Infatti, l'attivazione di HIF1α rimodella profondamente il metabolismo energetico con l'espressione di vari geni collegati (TABELLA 5), come trasportatori del glucosio che rendono ampiamente disponibile il glucosio per la glicolisi (GLUT1 e GLUT3), enzimi glicolitici (esochinasi, aldolasi, P-fruttochinasi, P-glicerocinasi e lattato-deidrogenasi), e proteine per il controllo del contenuto di protoni (MTC4 o trasportatore extracellulare di lattato, scambiatore Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e anidrasi carbonica che catalizza CO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>→ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [16].

Funzione	Espressione di geni HIF1 $\alpha$ -dipendenti
Aumentata disponibilità di glucosio	Sovraespressione dei trasportatori del glucosio: Glut1 e Glut3
Alta glicolisi	Sovraespressione di Esochinasi, Aldolasi, Fosfofruttochinasi, Fosfoglicerochinasi, Lattatodeidrogenasi
Controllo del contenuto di protoni	Sovraespressione di: <ul style="list-style-type: none"> <li>- MTC4 (Canale trasportatore extracellulare di lattato)</li> <li>- Scambiatore Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup></li> <li>- Anidraasi carbonica: CO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>→HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></li> </ul>
Attivazione della risposta infiammatoria riparativa	Aumentata espressione di NFkB e sua attivazione Espressione di recettori per allarmine Espressione dei geni per la staminalità Espressione recettori per chemiochine e MMPs

**TABELLA 5 – Metabolismo energetico dei tumori maligni: attivazione di HIF1 $\alpha$ , trascrizione genica e funzioni coinvolte (proprietà della malignità).**

#### 1.4.7- Capacità invasiva (Figura 11)

È la capacità del tumore di crescere al di là dei confini naturali del tessuto da cui deriva. Nel caso specifico del carcinoma vescicale, si intende la membrana basale su cui poggia lo strato basale e gli altri strati dell'epitelio vescicale (urotelio). L'invasività è una proprietà importante dei tumori maligni che necessita dell'azione combinata e coordinata di numerosi geni dipendenti in varia maniera dall'asse HIF/NFkB. Alcuni si possono anche trovare mutati con guadagno (oncogeni) o perdita (geni oncosoppressori) di funzione, accelerando la progressione verso la malignità.



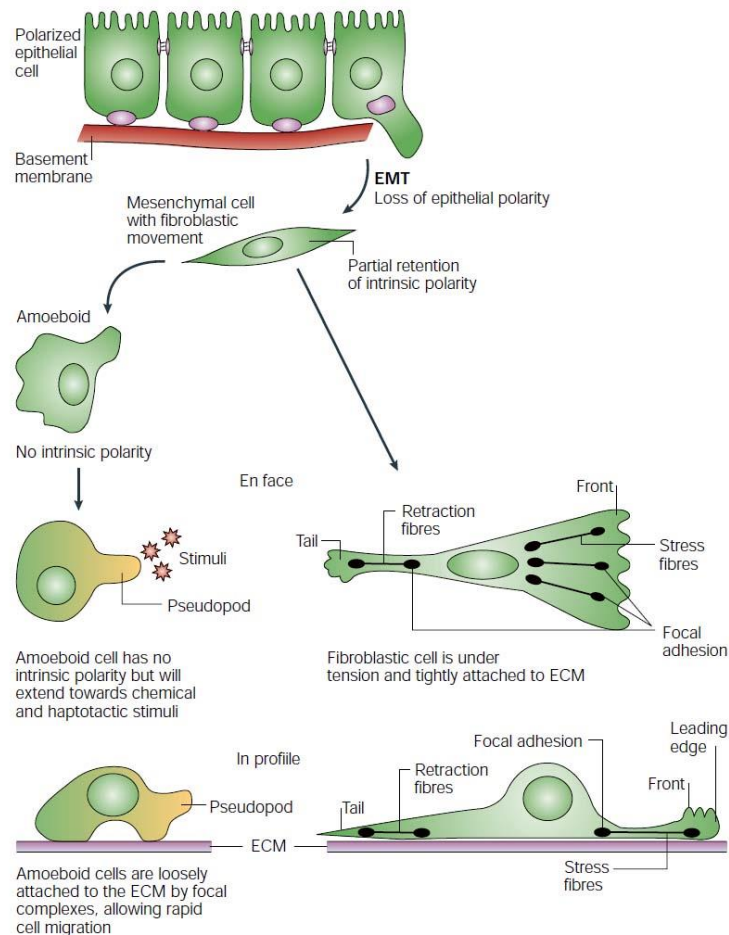
**Figura 11 – Schema semplificato della cascata per la genesi dell'invasione e delle metastasi.**

I geni coinvolti nell'acquisizione della capacità invasiva appartengono a diverse classi funzionali:

- 1) Rimodellamento della ECM (matrice extracellulare) con alterazioni della sua composizione (soprattutto delle isoforme del collagene, fibronectine, elastine, e altre);
- 2) Rimodellamento delle molecole di adesione sia tra le cellule che alla ECM;
- 3) Guadagno di funzione delle metalloproteasi (MMPs). La ECM e le membrane basali vanno incontro a un fisiologico ricambio delle loro molecole affidato soprattutto alle MMPs. Questi enzimi sono deputati alla demolizione di queste molecole e ai loro inibitori o TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases), per cui il guadagno della funzione proteasica può avvenire sia per mutazioni attivanti le MMPs (oncogeni), sia per sovraespressione delle stesse sotto il controllo dell'asse HIF/NFκB, sia, infine, per perdita di funzione dei TIMPs (geni oncosoppressori) in seguito a mutazioni inattivanti.
- 4) La direzione dell'invasione viene determinata dalle modificazioni del citoscheletro (microtubuli e microfilamenti), dagli pseudopodi o lamellopodii a un polo della cellula tumorale (verso il gradiente chemiotattico, come vedremo in seguito) e dal guadagno di motilità per l'interazione con la ECM modificata (Figura 12) [7][61]. La cellula trasformata che va incontro alla EMT (transizione epitelio-mesenchimale) perde la tipica architettura polarizzata (polo secretivo, polo basale, polo laterale) e si comporta come un fibroblasto e derivati (es. leucociti). Vi sono vari tipi di movimento come quello diretto da stimoli chemiotattici o come i



movimenti ameboidi che comunque necessitano di una riorganizzazione del citoscheletro molto diversa e più dinamica rispetto a quella posseduta dalle cellule epiteliali (Figura 12).



**Figura 12 – Meccanismi dei movimenti cellulari. Modificazioni del citoscheletro e polarizzazione (direzione) del movimento.**

#### 1.4.8-Motilità e capacità di migrazione polarizzata.

La formazione delle metastasi è la caratteristica più saliente della malignità di un tumore. La formazione delle metastasi è stata paragonata ad una difficile corsa ad ostacoli: affinché un tumore possa dar luogo a metastasi si devono verificare numerose condizioni favorevoli, alle quali partecipano in maniera coordinata un grande numero di geni (Figura 13). Tali geni sono direttamente o indirettamente trascritti e coordinati sotto il controllo dell'asse HIF/NFκB; più raramente alcuni di essi possono presentare mutazioni attivanti che comunque accelerano la formazione della metastasi. Qui di seguito verranno esaminate le condizioni necessarie all'evento metastatico e la descrizione dei principali geni coinvolti, sottolineando la loro attivazione da parte dell'asse HIF/NFκB.

Di seguito sono illustrate tutte le tappe necessarie alla formazione delle metastasi (Figura 13).

La cellula tumorale progredita deve:

1-distaccarsi dal tessuto del tumore primitivo;

2-superare una barriera per raggiungere un vaso o un'altra via (grazie ai meccanismi invasivi descritti sopra);

3-entrare nel lume di un vaso (intravasazione), di un canalicolo o altra cavità, superando delle barriere stromali e la parete specifica di quella cavità (parete vasale, parete epiteliale, mesoteliale, ecc.), grazie a un movimento di migrazione orientato da un gradiente chemiotattico;

4-migrare, senza danni, nel nuovo ambiente, sia per le interazioni con le cellule presenti (piastrine, leucociti, ecc.), sia per attivazione impropria dei fattori dell'emostasi (trombosi da metastasi) e formazione di aggregati (emboli metastatici);

5-fermarsi (homing) in un sito distante dal tumore primitivo;

6-superare una nuova barriera (extravasazione) per lasciare il lume e trovare un microambiente favorevole alla proliferazione e formazione di un nuovo tumore.

Queste tappe richiedono il verificarsi di condizioni favorevoli e l'azione coordinata di numerosi geni mutati, più spesso sovraespressi sotto il controllo dell'asse HIF/NFκB.

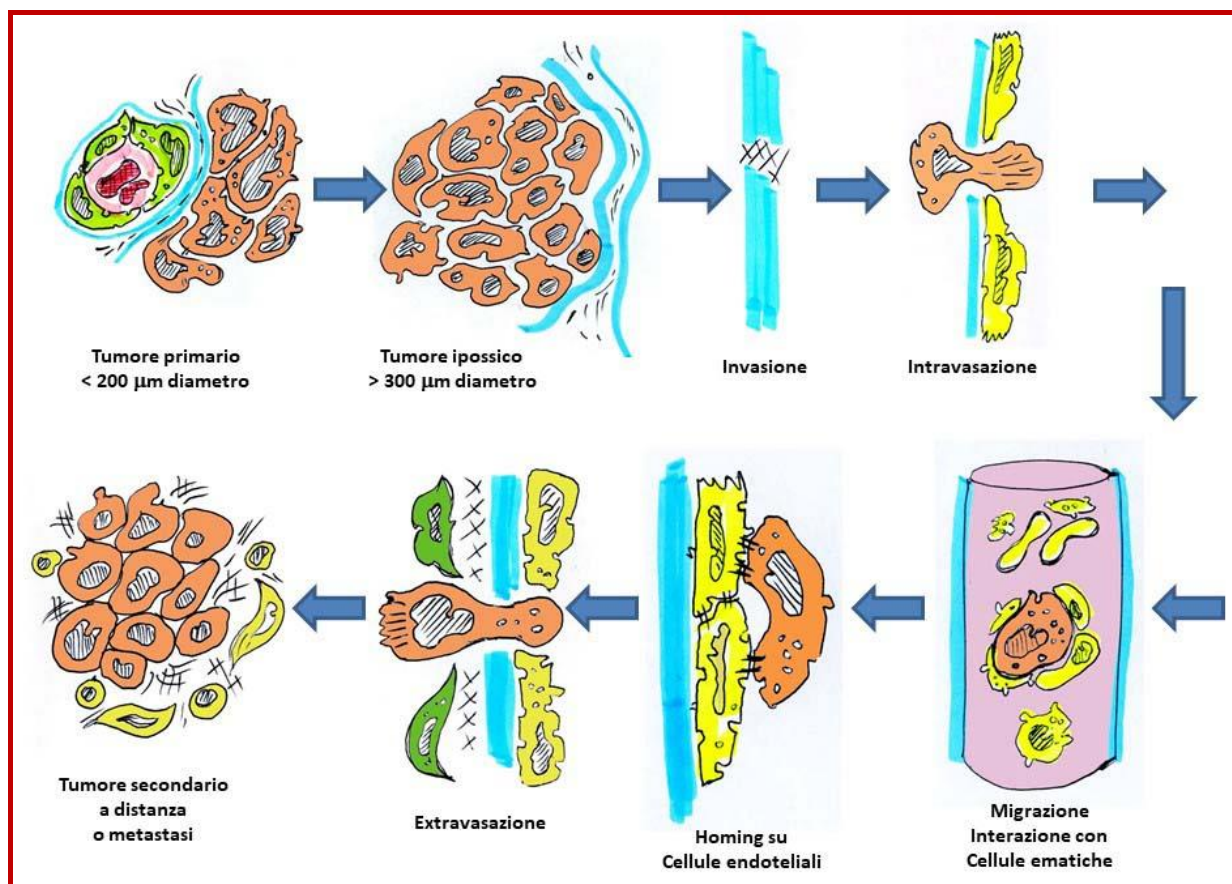


Figura 13 - Tappe della cascata nella patogenesi delle metastasi.

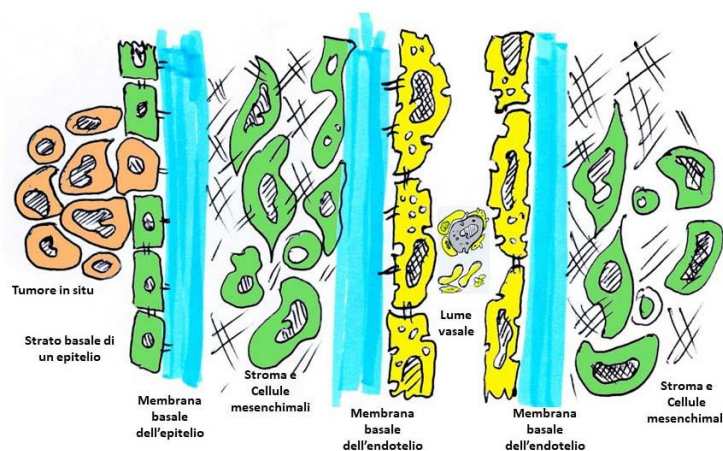
1.-Il Distacco dal tumore primitivo avviene grazie ad alterazioni delle giunzioni cellula-cellula e cellula-ECM. Le alterazioni conseguono anzitutto all'azione abnorme di alcuni oncogeni con azione tirosinchinasica (src, ecc.) su alcune molecole dei complessi giunzionali (giunzioni strette, desmosomi, giunzioni comunicanti o gap junctions) e della placca di adesione (o emidesmosoma).

Le connesine iperfosforilate portano alla disorganizzazione delle gap junctions e alla crescita in vitro non regolata per assenza dell'inibizione da contatto operata da queste giunzioni.

Ai fini del distacco vengono disorganizzate le giunzioni strette, i desmosomi e gli emidesmosomi o placche di adesione (cellula-ECM), che normalmente costituiscono, con il citoscheletro associato, i maggiori responsabili della stabilità del tessuto. L'iperfosforilazione o l'espressione impropria di vari componenti delle giunzioni strette (es. e-caderine) in un tumore implica il distacco facilitato delle cellule tumorali dal tumore primitivo. Anche l'attività dell'asse HIF/NFκB è responsabile della disorganizzazione dei complessi giunzionali (anche nel corso di risposte fisiologiche) con due meccanismi: a) rimodellamento delle molecole di adesione (es. e-caderine) e dei loro controrecettori sotto il controllo di NFκB, come avviene per la migrazione dei leucociti attivati e delle cellule staminali e b) disorganizzazione delle giunzioni strette delle cellule endoteliali per aumento di nucleotidi ciclici sotto l'azione di enzimi proinfiammatori (prostaglandine, COX-2, i-NOS, inducibili da NFκB) con aumento della permeabilità e rottura della barriera endoteliale.

Il distacco dalla matrice stromale (ECM) si verifica sia per alterazioni delle placche di adesione, soprattutto ad opera di alcune tirosinchinasi oncogeniche, sia per alterata espressione delle isoforme delle molecole della ECM [61]. La dinamica e gli equilibri della tirosin-fosforilazione sono regolati da vari enzimi sotto il controllo dell'asse HIF/NFκB [29][19].

2.-Il superamento delle barriere per raggiungere la via di migrazione (vasi, canalicoli, cavità). Le barriere sono costituite dalle membrane basali dei tessuti, dalla matrice stromale ECM, dalla parete di un vaso sanguigno, epiteliale o mesoteliale (Figura 14).



**Figura 14 – Schema delle barriere che la cellula tumorale deve superare per dare metastasi a distanza dal tumore primario.**

Invasività e motilità sono necessari per raggiungere e superare la parete di un vaso (parete vasale ematica o linfatica), di un canalicolo (epiteli delle vie respiratorie o digestive, canalicoli vari, canale endimale, ecc.) o di un'altra cavità (pleura, peritoneo, altre barriere mesoteliali).

L'alterazione della composizione della ECM può favorire la migrazione grazie all'azione pathfinders (determinano la direzione della migrazione) di alcune proteine ECM e dei controrecettori espressi sotto il controllo di HIF/NFκB sulla cellula tumorale. Anche questo fenomeno è simile alla fisiologica migrazione polarizzata di leucociti e cellule staminali diretta dall'asse HIF/NFκB.

3.-Migrazione. Raggiunto il lume di un vaso, canalicolare o cavitario, la migrazione della cellula tumorale viene condizionata dal flusso locale dei liquidi eventualmente presenti e dall'anatomia delle vie stesse, oppure da un gradiente chemiotattico che guida attivamente la cellula tumorale verso l'origine del gradiente. L'attivazione dell'asse HIF/NFκB permette l'espressione, nelle cellule tumorali, dei geni necessari alla migrazione, come i recettori per chemochine e altri fattori chemiotattici e le opportune modificazioni del citoscheletro. Per esempio, l'espressione del CXCR4, il recettore per alcune chemochine, rappresenta un sicuro marcatore prognostico negativo per il verificarsi di metastasi in molti tumori epiteliali [7]. È stato identificato un gene oncosoppressore, nm23 (non-metastatic 23), la cui funzione è legata a una normale e ben regolata organizzazione del citoscheletro negli pseudopodi per la migrazione (lamellopodii). La perdita di funzione o la mancata espressione in omozigosi di nm-23 è altamente predittiva della formazione di metastasi. L'importanza del gene oncosoppressore nm-23 nella formazione delle metastasi è anche dimostrata dal diverso tasso di sopravvivenza che è stato osservato nel carcinoma mammario e in altri tumori. Infatti, la bassa o assente espressione di nm-23 riduce drasticamente la sopravvivenza, mentre questa è alta quando i livelli di nm-23 sono alti o normali. Nel tumore vescicale questo gene ancora non è stato dimostrato. (Figura 15).

## Valore prognostico dei livelli di nm-23 nel ca.mammario

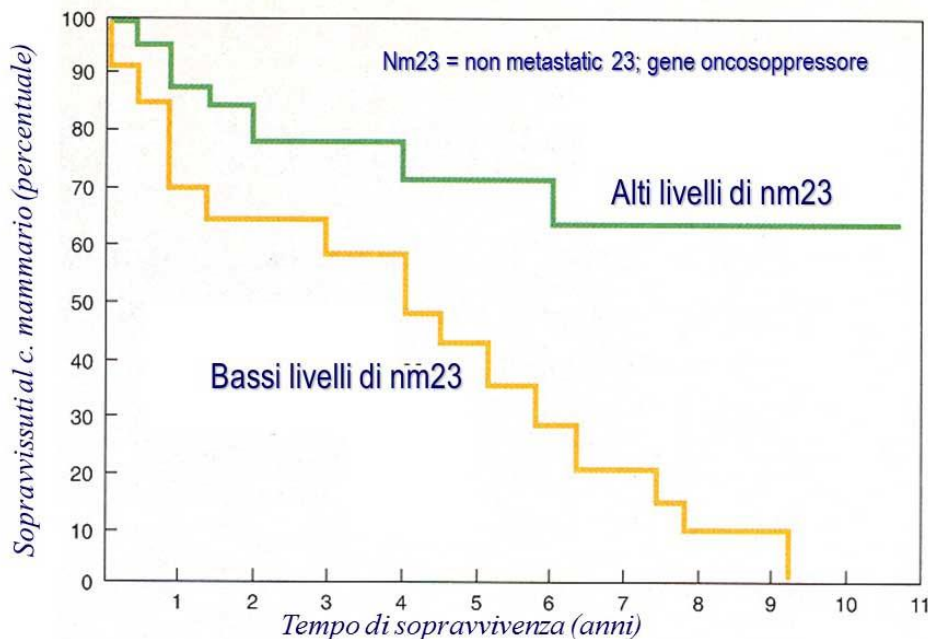


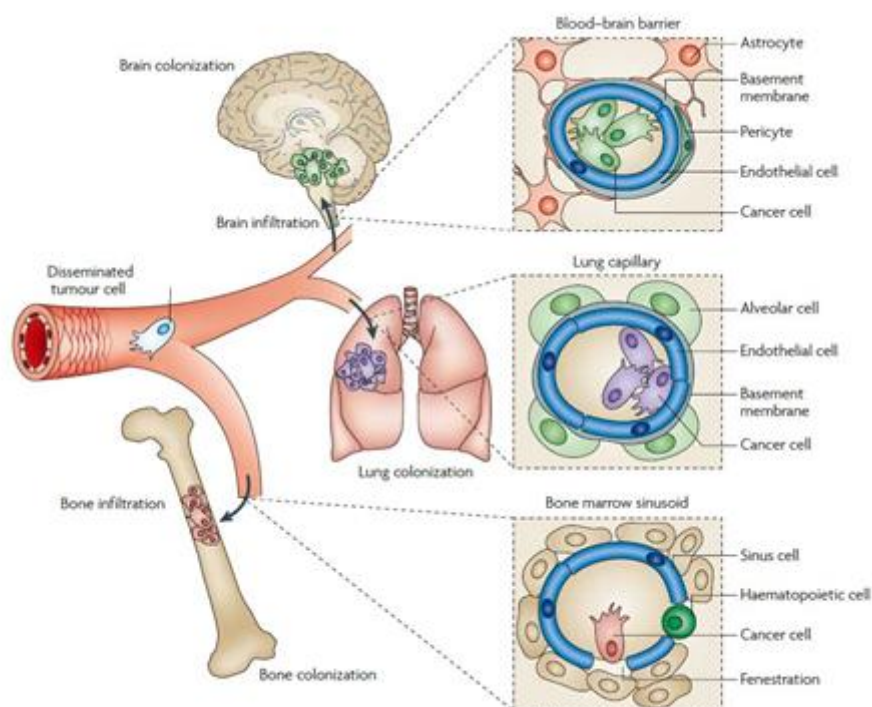
Figura 15 – L'importanza del gene oncosoppressore nm-23 nella formazione delle metastasi

Nel corso della migrazione è fondamentale la sopravvivenza. Nel nuovo microambiente la cellula tumorale può interagire con le cellule ivi presenti, come piastrine, leucociti vari e macrofagi, ed ottenere diversi effetti opposti tra loro: protezione (emboli metastatici cellule tumorali /piastrine/granulociti) o inibizione/citolisi da immunità naturale o specifica (linfociti e macrofagi), come si vedrà più avanti.

4.-Homing. La migrazione di una cellula tumorale può essere fermata da una forte interazione delle sue molecole di adesione con i controrecettori presenti sulle cellule della parete della via di migrazione, come cellule endoteliali, epiteliali o mesoteliali. Questi controrecettori possono essere presenti costitutivamente oppure indotti da un'attivazione del sistema HIF/NFkB. Quest'ultimo evento si realizza in parallelo con la produzione del gradiente chemiotattico per una eventuale infiammazione distrettuale, lontana dal tumore primitivo e suggerisce che la sede di homing (e di metastasi) può essere condizionata da fattori contingenti (un processo infiammatorio distante dal tumore primitivo) o da fattori costitutivi come l'espressione fondamentale in un tessuto di controrecettori per le cellule che esprimono quella molecola di adesione/ligando (organotropismo). Non sono ancora ben noti i meccanismi e i tipi di infiammazione che regolano questi fenomeni.

5.-Superamento di barriere per raggiungere un altro tessuto ed attecchimento con formazione di un nuovo tumore (Figura 14 e Figura 16). Per questa tappa sono necessari gli stessi geni di cui sopra al punto 1 e 3. Il

processo infiammatorio distrettuale, attraverso gli stessi meccanismi della migrazione leucocitaria, disorganizza le giunzioni delle barriere (endoteliale, epiteliale, mesoteliale, ecc.) e permette alla cellula tumorale fermata dall'homing di extravasare ed interagire con il nuovo tessuto. Il microambiente favorevole (presenza di fattori di crescita e assenza di una risposta immune contro il tumore), permette una rapida crescita e organizzazione del nuovo tessuto tumorale a formare la metastasi. Inizialmente, questa risulta monoclonale, per almeno quattro aspetti: a) cariotipo omogeneo; b) popolazioni cellulari a scarsa/simile differenziazione; c) omogeneità metabolica; d) omogeneo grado di malignità. Tuttavia, con il tempo questa uniformità tende a scomparire sia per l'instabilità genetica che per le influenze del microambiente che possono far progredire ulteriormente la malignità nelle diverse regioni tumorali.



**Figura 16 – Meccanismi di Homing, organotropismo e barriere.**

#### **1.4.9-Microambiente e controllo immunitario.**

La progressione di un tumore verso la malignità è un fenomeno molto più complesso rispetto al rimodellamento dell'espressione genica da parte dell'asse HIF/NFκB fin qui prospettato.

Negli ultimi anni, infatti, hanno acquistato importanza anche alcuni aspetti del microambiente tumorale, in particolare, la composizione e le modificazioni del tessuto ospite e adiacente al tumore e le cellule che infiltrano il tumore o che formano il suo stroma. Tutte le cellule che qui risiedono o vengono richiamate dalla presenza del tumore vanno incontro a risposte di attivazione i cui componenti possono facilitare sia la crescita del tumore che l'acquisizione delle varie caratteristiche della malignità [35].

La Figura 17 schematizza i vari componenti cellulari che possono condizionare in questo senso il tumore. Da una parte le cellule residenti (cellule stromali, fibroblasti, cellule muscolari, cellule immunitarie, macrofagi e altri leucociti, cellule staminali varie, ecc.) e cellule richiamate dalla presenza del tumore che libera sostanze chemiotattiche o segnali di danno (allarmine) che le richiamano e/o le attivano.

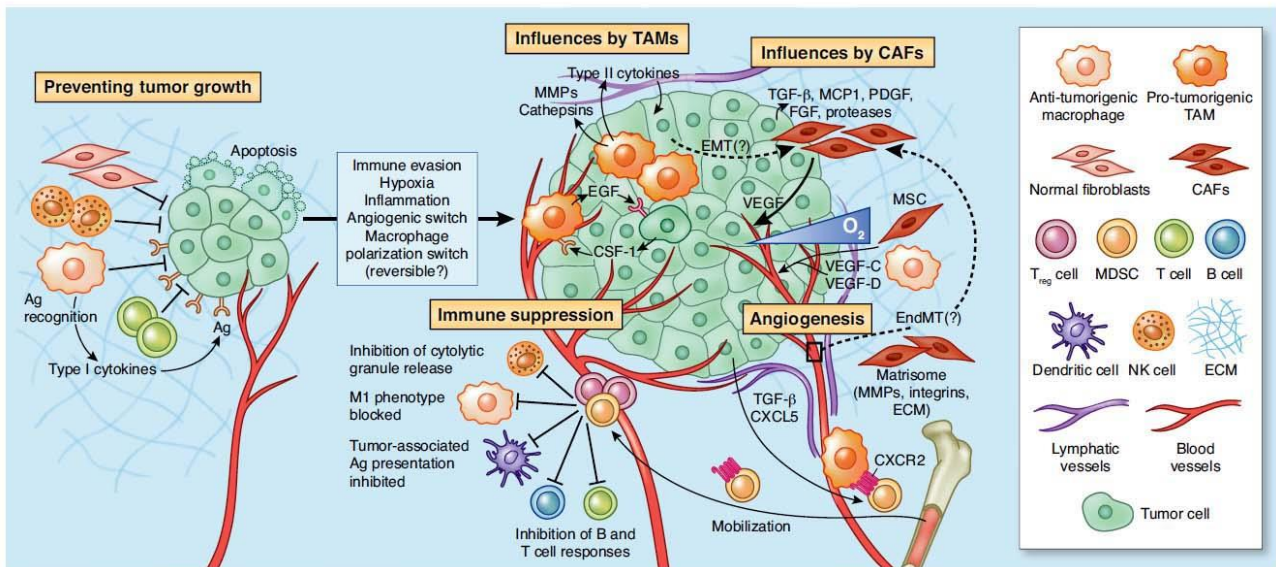


Figura 17 – Microambiente tumorale [35]

La Figura 18 schematizza il ruolo che altre componenti ambientali, con cui interagisce una cellula tumorale migrante, possono avere nella progressione maligna. In particolare, da parte di cellule endoteliali, macrofagi residenti, leucociti circolanti e piastrine [35].

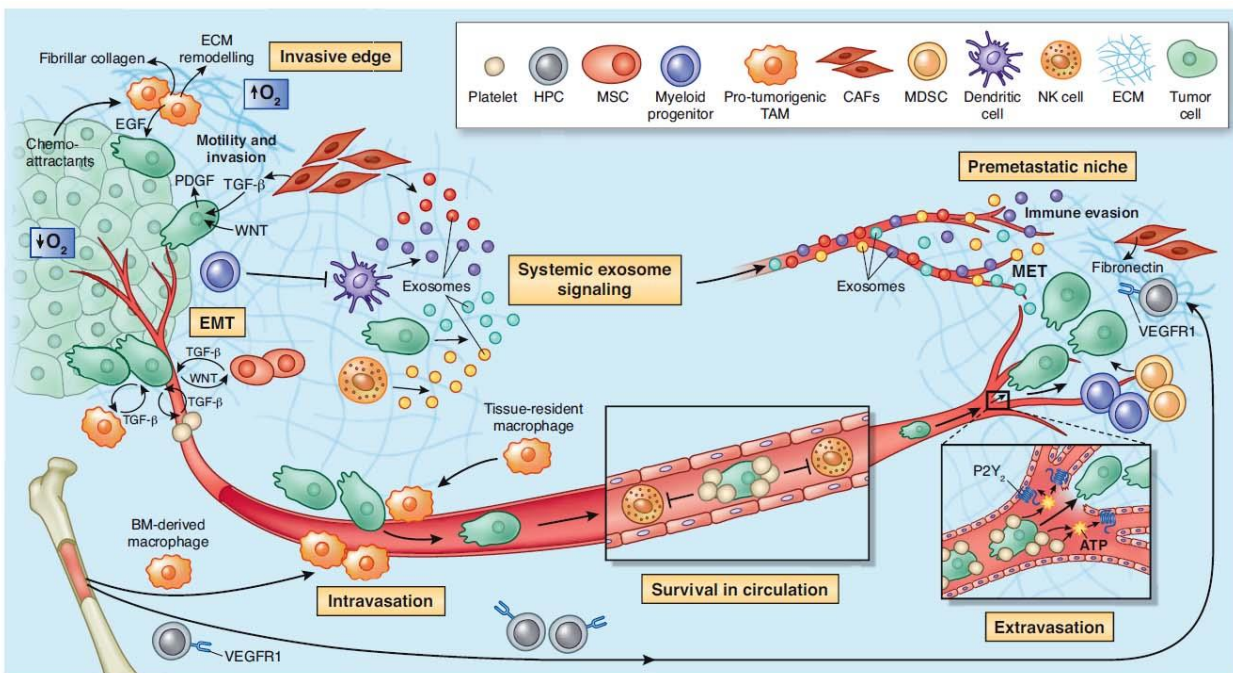


Figura 18 – Microambiente cellulare e tissutale che influenza la patogenesi delle metastasi [35]

Infine, è noto che uno stato di immunosoppressione o comunque una deficienza della risposta immune favorisce sia la crescita che la progressione di un tumore. Oggi è chiaro che il sistema immunitario esercita un importante controllo sia sulla crescita che sulla progressione ed evidenziazione clinica di un tumore.

In particolare, i linfociti citotossici (CD8+) e i Natural Killer sono in grado di limitare la crescita del tumore mediante la loro specifica azione citotossica e l'infiltrazione di un tumore da parte di queste cellule rappresenta un fattore prognostico positivo.

Purtroppo, una delle caratteristiche della malignità è la capacità da parte del tumore di evadere il controllo normalmente esercitato dal sistema immunitario attraverso due meccanismi principali. Il controllo immune sul tumore si esercita attraverso una risposta cellulare di tipo T (rigetto) contro gruppi antigenici di proteine mutate e quindi riconosciute estranee nelle sottopopolazioni cellulari che le contengono. Col tempo avviene una selezione delle sottopopolazioni che non presentano questi antigeni forti per cui la risposta di rigetto si spegne. Un secondo meccanismo è rappresentato dalla produzione di numerose sostanze che inibiscono o sopprimono la risposta immune rendendo il tumore tollerabile dal sistema. Tra queste sostanze vanno ricordati alcuni mediatori proinfiammatori, citochine e alcuni interferon [22].

La migliore conoscenza di questi meccanismi ha recentemente suggerito terapie immunitarie tese a rafforzare la risposta e a facilitare il riconoscimento degli antigeni tumore-specifici [11].

#### **1.4.10 – Progressione verso la malignità: Risposta biologica integrata.**

Da quanto esposto sopra, va sottolineato che la progressione maligna può essere considerata prevalentemente una risposta biologica integrata di adattamento all'ipossia e di riparazione del danno mediante la "fisiologica" attivazione di un pathway infiammatorio-riparativo (asse HIF/NFκB), altamente conservato nel corso dell'evoluzione. Va, tuttavia, notato che le caratteristiche e gli effetti di questa risposta sono quasi sovrapponibili alla "transizione epitelio-mesenchimale" spesso associata a mutazioni di geni connessi all'invasione e metastasi. Questo vuol dire che, nel panorama di alta instabilità genetica del tumore, i geni mutati (la cui espressione normale è tipicamente dipendente da HIF e/o da NFκB) possono dare un ulteriore e più forte contributo alla progressione verso la malignità.

Questi aspetti molecolari della progressione maligna sono stati dimostrati in numerosi tumori solidi, come nel carcinoma prostatico [41], carcinoma mammario [54], glioblastoma [55], carcinoma tiroideo [57], carcinoma pancreatico, mesotelioma [39] e in modelli cellulari derivati da tumori umani. Mentre non vi sono studi relativi al carcinoma vescicale nei vari stadi della progressione.

Questa tesi si prefigge di portare un contributo a questo quadro generale di patogenesi della malignità anche per il carcinoma della vescica, presentando dati molecolari che confermano come l'ipossia e la successiva attivazione di una forte risposta infiammatoria riparativa siano la driving force per comprendere la progressione del carcinoma vescicale in situ verso la malignità con invasione e metastasi.



## 2-Scopi della tesi e Protocolli sperimentali

### 2.1 – Obiettivi generali

- 1 - Definire il ruolo dell'ipossia e dell'espressione genica di adattamento all'ipossia (HIF) e proinfiammatoria (NFkB) nella progressione del carcinoma vescicale.
- 2 - Stabilire una relazione di causa/effetto tra le condizioni ipossiche, l'attivazione dell'espressione genica proinfiammatoria e la genesi del fenotipo maligno in opportuni modelli cellulari.
- 3 –Rivedere la letteratura sugli effetti di inibitori di HIF1 $\alpha$  (inibitori del rimodellamento ipossico) e di NFkB (inibitori della risposta proinfiammatoria) nel bloccare o rallentare la genesi del fenotipo maligno in vitro.
- 4 - In pazienti selezionati proporre come terapia off-label l'uso di inibitori di HIF1 $\alpha$  (es. digossina) e di NFkB (es. vari antinfiammatori) come terapia coadiuvante del carcinoma vescicale.

### 2.2-Protocolli di studio per i singoli obiettivi

Obiettivo 1: I pazienti selezionati (Dipartimento di Urologia, Università di Roma Sapienza) affetti da tumore vescicale verranno sottoposti a TURB (Resezione Vescicale Trans-Uretrale). I campioni vescicali ottenuti saranno studiati sotto il profilo istopatologico ma anche della biologia molecolare (espressione genica-mRNA e proteine), dopo processazione con la tecnica della Laser Capture Microdissection (LCMD). L'espressione genica dipendente da HIF1 $\alpha$  e quella dipendente da NFkB verranno analizzate mediante cards microfluide (arrays a bassa densità) progettate per contenere i geni più rappresentativi delle famiglie controllate dai due fattori di trascrizione. L'attivazione di HIF1 $\alpha$  e NFkB verrà analizzata mediante la valutazione della loro traslocazione nel nucleo dopo frazionamento nucleo/citoplasma delle frazioni tissutali ottenute per LCMD.

Obiettivo 2: Come modelli cellulari verranno utilizzate cellule staminali di tumore vescicale fornite dal Prof. Giorgio Stassi del Dipartimento di Oncologia dell'Università degli studi di Palermo. Verrà anche analizzata la loro capacità invasiva (saggi di invasione), la capacità di migrazione (saggi di migrazione stimolata da chemochine) dopo attivazione da trattamento ipossico.

Obiettivo 3: il controllo di alcune proprietà del fenotipo maligno verrà studiato mediante due strategie: a) Mediante silenziamento o KO di uno dei due fattori di trascrizione o di geni coinvolti nelle proprietà del fenotipo maligno, in particolare di RAGE, P2X7 o TLRs; b) mediante l'uso di inibitori o modulatori di HIF1 $\alpha$  (digossina, chetomin) e di NFkB (Partenolide, CR3294, aspirina, ecc.).

Obiettivo 4: Verrà proposto l'uso off-label di farmaci già utilizzati per altre patologie, come l'aspirina, altri NSAIDs, la digossina e l'acriflavina in pazienti selezionati con end-points primari di aumento del survival e di diminuzione delle recidive.

### **3.-MATERIALI E METODI**

#### **3.1- Arruolamento e studio clinico dei pazienti**

Nel Dipartimento di Urologia del Policlinico Umberto I dell'Università la Sapienza di Roma, sono stati selezionati 18 pazienti di cui 14 maschi e 4 femmine di età compresa fra 50 e 80 anni, ai quali era stata fatta diagnosi di carcinoma della vescica secondo gli standard diagnostici attuali. (TABELLA 6). L'88,8% dei pazienti avevano tra i fattori di rischio il fumo di sigaretta mentre il 55,5% erano affetti da Ipertensione arteriosa. La diagnosi è stata espressa tramite l'uretroscopia in 7 pazienti; con l'ecografia dell'apparato urinario in 9 pazienti e con TC addome in 2 pazienti. La sintomatologia più frequentemente riscontrata è stata l'ematuria (50% dei casi). Nel 50% dei casi si è trattato di un tumore primitivo mentre nei restanti pazienti è stata una recidiva dello stesso tumore.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TURB (Trans-Uretral Resection of Bladder), procedura chirurgica endoscopica di resezione ed asportazione della lesione vescicale.

#### **3.2- Campioni biologici prelevati, storage e analisi**

Nel corso della TURB da ogni paziente sono stati prelevati tre campioni di tessuto vescicale: due campioni dalla lesione tumorale ed un campione di tessuto ospite adiacente (presumibilmente normale). I reperti sono stati conservati per lo studio e le varie analisi come di seguito:

- a) un campione di tumore fissato in formalina per l'istopatologia standard e la diagnosi anatomicopatologica.
- b) un campione di tumore, rapidamente congelato in azoto liquido e conservato in freezer a -80°C per la LCMD (Laser Capture Micro-Dissection) e le successive analisi molecolari.
- c) Un campione di tessuto "sano" ospite adiacente del tumore, presumibilmente normale, rapidamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C per la LCMD e le successive analisi molecolari da paragonare come controllo al tessuto tumorale di cui al campione b).

**TABELLA 6 – Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati per questo studio.**

Caratteristica		N°	%
SESSO	4 F/14 M		
ETA'	50-60 aa 60-70 aa 70-80 aa >80 aa	2 6 6 4	66,6% TRA I 60 ED 80 ANNI
COMORBIDITA'	Fumo Ipertensione arteriosa Cardiovascolari Dislipidemia Patologie autoimmuni Altre neoplasie Diabete Tipo 2 Insufficienza renale cronica BPCO Patologie infettive (Vaiolo)	16 10 7 7 3 2 2 2 2 2 1	88,8% 55,5% 38,8% 38,8% 27,7%
SINTOMI	Ematuria disuria	9 2	50 %
STADIAZIONE	pT0 pTa pT1 pT2	2 11 2 3	11,11% 61,11% 11,11% 16,6%
FOLLOW-UP	RECIDIVA STESSO GRADO GRADO INFERIORE GRADO SUPERIORE DECESSI	6 4 1 1 4	33,33% 66,66 %

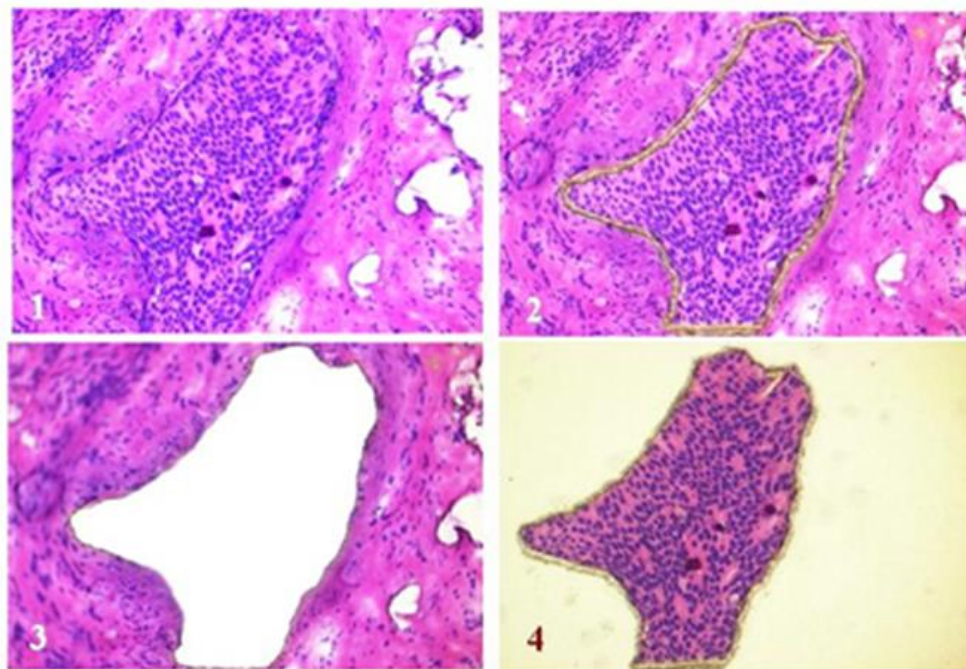
### 3.3- Metodiche di laboratorio

Qui vengono brevemente descritte le metodiche che sono state utilizzate per l'analisi dei campioni prelevati dai pazienti descritti nella TABELLA 6.

#### 3.3.1- Morfologia.

Per la diagnosi istopatologica i campioni, dopo opportuna fissazione in formalina 4% in tampone, venivano disidratati in una serie crescente di etanolo, passati in xilolo quindi inclusi in paraffina secondo le schedule standard. Sezioni fini venivano chiarificate in xilolo e colorate con ematossilina/eosina e sottoposti all'osservazione dell'anatomo Patologo per la diagnosi morfologica, la stadiazione e il grado citologico.

**3.3.2 -LCMD:** la tecnica della Laser Capture Micro-Dissection (Figura 19) permette di isolare mediante microdissezione con laser UV le cellule di interesse (es. cellule tumorali, cellule normali, infiltrati leucocitari, microvasi, cellule stromali, ecc.), prelevarle e riporle in microprovette per procedere all'estrazione di acidi nucleici (DNA, RNA) o proteine per le successive analisi (amplificazione, sequenziamento, rt-PCR, WB [Western Blot] e proteomica).



**Figura 19 – Tappe della LCMD. 1.-Sezione tissutale al criostato di circa 6-7 mm. 2.-Taglio con il laser che identifica un'area omogenea di cellule tumorali con assenza di vasi. 3.-Tessuto ospite rimasto dopo il prelievo della frazione dissezionata nella figura precedente. 4.-Frazione tissutale recuperata mediante il cap della microprovetta dove avverrà l'estrazione degli acidi nucleici o delle proteine.**

Il grande vantaggio di questa procedura è di conferire cellulo-specificità alle analisi da eseguire e di potenziare la significatività dei dati ottenuti (per l'omogeneità del tipo cellulare esaminato) e la loro validità statistica, potendo in tal modo ridurre il numero dei campioni e dei pazienti da studiare.

L'apparato di LCMD è costituito da un microscopio ottico che permette di individuare facilmente le cellule di interesse e da un dispositivo laser UV finemente controllato da un software che permette di tagliare la sezione di tessuto e la membrana di PEN sottostante. Il laser UV consente velocità e precisione notevoli e crea una maggiore risoluzione consentendo così la cattura di singole cellule di ridotte dimensioni oppure di piccoli gruppi di cellule. La LCMD permette di selezionare ed ottenere popolazioni cellulari pure da un tessuto eterogeneo con un minimo di contaminazione. Lo strumento è dotato di un efficace sistema di posizionamento per ottenere una migliore accuratezza e stabilità. [1][33]

Il software, inoltre, possiede numerose routine per a) la selezione dei diversi tipi di tessuto nello stesso campione, utilizzando marcatori laser di diverso colore con la raccolta differenziata in varie microprovette; b) il calcolo dell'area selezionata in  $\mu\text{m}^2$  e, alla fine, del numero di cellule contenute nelle frazioni dissezionate; c) recentemente è stata aggiunta una routine per il calcolo dello spessore della sezione e, quindi, della massa cellulare media (in  $\mu\text{m}^3$ ). Tutti questi valori sono utili per determinare, per esempio, la concentrazione/cellula delle molecole di interesse (DNA, RNA o proteina).

Tappe della Laser Capture Micro-Dissection: Dai campioni congelati a  $-80^\circ\text{C}$  si preparano al criostato sezioni relativamente spesse (7-8  $\mu\text{m}$ ), poste su dei vetrini ricoperti di una membrana di PEN (polietilene naftalato) e quindi colorate con coloranti contenenti reagenti di protezione degli acidi nucleici e, in particolare, dell'RNA (inibitore delle RNA-asi). In seguito, si procede al taglio delle sezioni con il laser UV per isolare i gruppi di cellule; sia quelli tumorali che quelli del tessuto ospite del tumore.

L'area sezionata con le cellule viene, infine, trasferita sul cap di una microprovetta contenente la soluzione di estrazione (Figura 19). Chiudendo il cap e agitando/incubando opportunamente la microprovetta, si procede all'estrazione.

### **3.3.3- Analisi molecolari effettuate sulle frazioni tissutali ottenute mediante LCMD**

Per dimostrare la reale attivazione dei due fattori di trascrizione (HIF1 $\alpha$  e NF $\kappa$ B) abbiamo cercato due evidenze: 1) la traslocazione nel nucleo dal citoplasma dei due fattori di trascrizione nelle frazioni nucleari e citoplasmatiche dei diversi tessuti microdissezionati (tumorale e tessuto ospite) e 2) la valutazione della trascrizione di geni tipicamente dipendenti da HIF1 $\alpha$  o da NF $\kappa$ B che presentano le specifiche sequenze di consenso. (Obiettivo 1)

### 3.3.4- Estrazione nucleo/citoplasma.

L'estrazione delle frazioni nucleo/citoplasma è stata ottenuta mediante l'uso di un kit (The Nuclear Extract Kit, TransAM, Active Motif). Tali frazioni sono state utilizzate nei saggi Western Blot. Per l'estrazione nucleo/citoplasma, da un pool di frazioni microdissezionate si è proceduto come segue. I pools di tessuto microdissezionato sono stati lavati con 5 ml di una soluzione fredda di PBS contenente un Inibitore delle Fosfatasi (PBS, Acqua distillata, Inibitore delle Fosfatasi). Questa soluzione previene modificazioni delle proteine (come la defosforilazione) bloccando l'attività delle fosfatasi, in modo da mantenere inalterate le condizioni dei tessuti. I campioni vengono trasferiti in provette coniche a freddo, centrifugati per 5 min a 500 rpm a 4°C. Il surnatante viene scartato e il sedimento trasferito in ghiaccio.

- Preparazione della frazione citoplasmatica:

Il sedimento è stato risospeso gentilmente in 500 µl di tampone Ipotonico (tampone Ipotonico 10X e acqua distillata) pipettando diverse volte e trasferito in tubi da microcentrifuga a freddo. Il tampone Ipotonico rigonfia le membrane cellulari rendendole più fragili. Sono stati aggiunti 25 µl di detergente e agitati vigorosamente per 10 sec ad alta velocità; in questo modo si favorisce il distacco delle proteine citoplasmatiche nel surnatante. La sospensione è stata centrifugata per 30 sec a 14.000 g a 4°C. Il surnatante (frazione citoplasmatica) è stato trasferito in un tubo freddo da microcentrifuga e poi conservato a -80°C. Il sedimento invece, è stato utilizzato per l'estrazione della frazione nucleare.

- Preparazione della frazione nucleare:

Il sedimento è stato sospeso in 50 µl di tampone completo di Lisi (DTT 10 mM, Tampone di Lisi AM1, miscela di Inibitori delle Proteasi) favorendo la solubilizzazione delle proteine nucleari. La sospensione è stata incubata in ghiaccio per 30 min a lenta agitazione e poi centrifugata per 10 min a 14.000 g a 4°C. Il surnatante (la frazione nucleare) è stato trasferito in una provetta da microcentrifuga e conservato a -80°C.

Le frazioni così ottenute, sono state quantificate mediante il saggio Bradford. Questo è un saggio colorimetrico che si basa sul legame del Blue di Coomassie alle proteine. È stato preparato un set standards da una proteina a concentrazione nota come la BSA (1mg/ml). I valori degli standards letti e ottenuti allo spettrofotometro, sono stati utilizzati per costruire una curva di riferimento con l'asse delle x=mg/ml e l'asse delle y=A (assorbanza), alla quale sono stati paragonati i valori di assorbanza dei campioni a concentrazione non nota per determinare le rispettive concentrazioni.

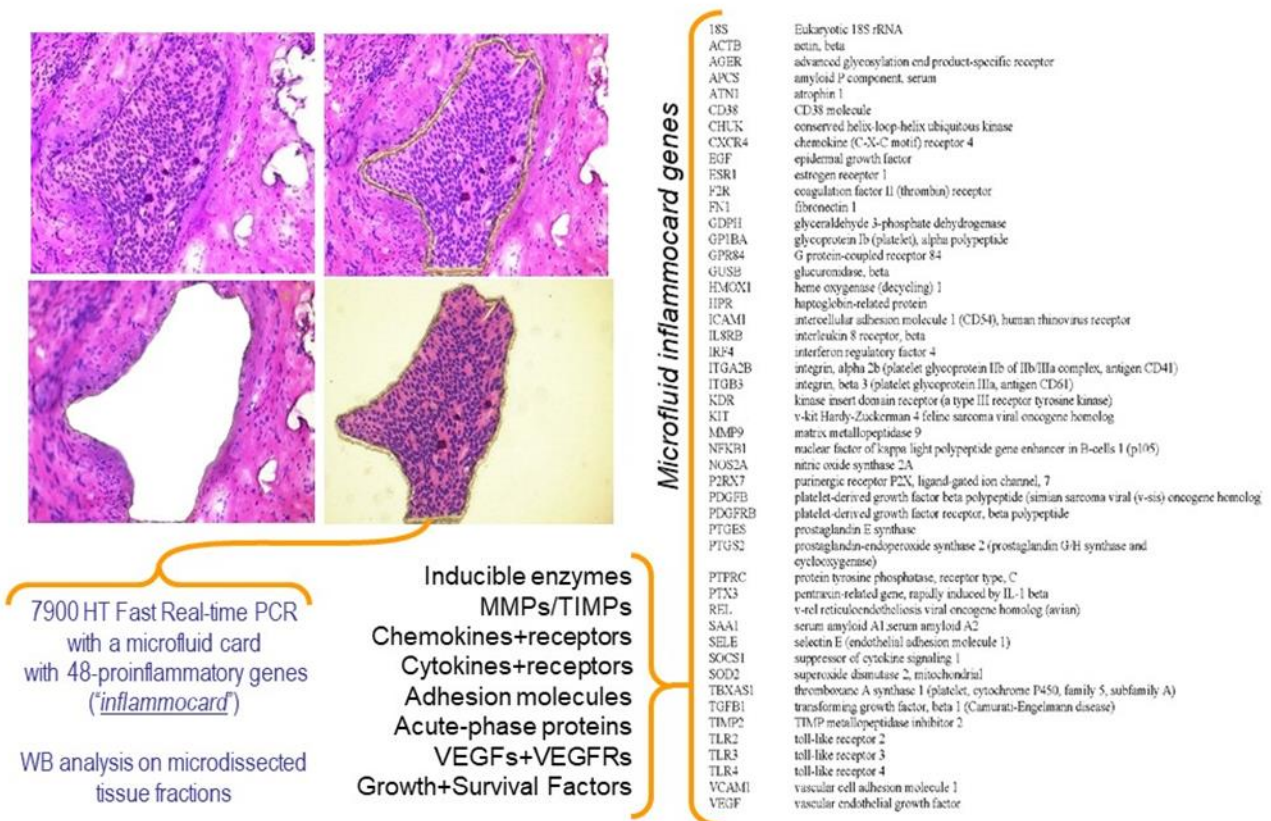
Le frazioni così ottenute sono state analizzate mediante Western Blot.

### 3.4 –Metodiche di biologia molecolare.

L'estrazione degli acidi nucleici avviene seguendo le schedule standard, seguita da retrotrascrizione per l'RNA ed amplificazione del cDNA mediante diversi cicli di PCR (Polymerase Chain Reaction) in 50 µl di una PCR Master Mix. Il prodotto ottenuto viene analizzato con array a bassa densità (card microfluidico da noi disegnate contenenti i primers dei geni di interesse, vedi TABELLA 7) mediante l'apparato di rt-PCR Applied 7600.

Negli arrays a bassa densità sono contenuti 48 geni di diverse famiglie associate alla progressione e all'attivazione dell'asse HIF/NFκB, oltre ai geni housekeeper di controllo per la quantizzazione (Figura 20).

## Bladder Ca Laser Capture Microdissection



**Figura 20–Utilizzazione delle frazioni tissutali ottenute per LCMD per la trascrittomiche con arrays a bassa densità (cards microfluidici) opportunamente definite da 48 geni che rappresentano le principali famiglie coinvolte nell'acquisizione del fenotipo maligno e controllate dall'asse HIF/NFκB.**

### 3.4.1- Elettroforesi su gel di Poliacrilammide (SDS-PAGE) e Western Blotting

Questa tecnica viene utilizzata per la separazione di proteine con carica elettrostatica. I campioni vengono sottoposti all'azione di un campo elettrico (80-100V per 2 ore). La separazione si basa esclusivamente sulle dimensioni delle proteine. L'analisi dimensionale si ottiene utilizzando un detergente anionico, il sodio dodecilsolfato (SDS) che si lega alle catene polipeptidiche ogni due residui amminoacidici. L'interazione provoca la destabilizzazione della struttura terziaria delle proteine denaturandole e conferendo loro una carica netta negativa che rende trascurabile la carica della proteina nativa. La separazione dei complessi proteina-SDS si ottiene permettendo la migrazione dei campioni lungo il gel discontinuo di poliacrilamide, composto dal gel di impacchettamento al 4%, nel quale vengono formati i pozzetti in cui si depositano i campioni da analizzare, e un gel di risoluzione, la cui percentuale dipende dalle dimensioni della proteina, che rappresenta la matrice in cui è avvenuta la separazione delle proteine.

I campioni vengono preventivamente condizionati nel tampone di caricamento. Questo contiene: TRIS-HCL 0.5M pH 6.8, 0.1% sodio dodecilsolfato (SDS), l'agente riducente Ditiotreitolo (DTT) 1X per la riduzione dei ponti di-solfuro, un addensante (glicerolo) ed un tracciante colorato (0.05% blu di bromofenolo) che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Dopo bollitura (2 min), una quantità simile (in µg) dei campioni viene caricata su ogni pozzetto del gel. Al termine della corsa elettroforetica, applicando un campo elettrico trasversale, le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana di fluoropolivinilidene (PVDF) secondo la metodica Western Blotting. Nel processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana, che vengono bloccati (blocking) ricoprendo la membrana con una miscela di proteine non specifiche del latte magro, liofilizzato, al 5%, in una soluzione di Tris 0.05M, NaCl e HCl 0.15M con 0.05% Tween-20 (TBS-T) a pH 7.4 per 1 ora a temperatura ambiente. Questo evita il legame non specifico dell'anticorpo primario su tali siti. La membrana viene quindi immersa in una soluzione contenente l'anticorpo primario per tutta la notte a 4°C (poiché tutti i siti della membrana sono stati bloccati, l'anticorpo aderisce alla membrana solo se si lega con il suo antigene specifico). Gli anticorpi primari nel nostro caso erano diretti contro le proteine e alle concentrazioni ottimizzate. Per esempio: per HIF-1α 1:200, per NF-κB 1:500, per COX-2 1:1000, per P2X7 1:500, per RAGE 1:500.

Seguono 4 lavaggi nel TBS-T da 5 min ognuno e poi si procede all'incubazione della membrana con gli anticorpi secondari accoppiati covalentemente alla Perossidasi di Rafano (HRP), per 1 ora, a temperatura ambiente e sotto lenta agitazione.

Le concentrazioni degli anticorpi sono state ottimizzate: IgG Anti-Mouse (GE Healthcare) 1:5000, IgG Anti-Rabbit (GE Healthcare) 1:5000, IgG Anti-Goat (S.Cruz Biotechnology) 1:10000.

Dopo i lavaggi (6 da 5 min ognuno), la membrana viene trattata con un agente che emette chemiluminescenza (ECL detection system Amersham, Buckinghamshire, UK). La rivelazione delle bande d'interesse si ottiene mediante autoradiografia, mettendo a contatto il filtro di nitrocellulosa con una pellicola fotografica, in seguito opportunamente sviluppata, e le bande evidenziate vengono quantificate mediante densitometria.



### 3.4.2- Estrazione dell'RNA totale dal tessuto intero e PCR

Al fine di caratterizzare l'espressione genica delle diverse proteine in cellule di tessuto normale, di tessuto di lesioni proliferative intermedie e di tessuto estratto da carcinoma, abbiamo proceduto all'estrazione dell'RNA e all'amplificazione delle sequenze codificanti per iNOS, COX-2 e NADPH ossidasi (gp91phox) mediante RT-PCR (reverse transcriptase-PCR). Questa tecnica accoppia la retrotrascrizione dell'RNA, per ottenere cDNA, all'amplificazione per PCR.

I campioni di tessuto vescicale di circa 50-100 mg di peso sono stati omogeneizzati utilizzando un buffer di lisi contenente DNA-asi, che eliminano il DNA, e un forte detergente, capace di denaturare proteine e in particolare di distruggere le RNA-asi. La fase di deproteinizzazione è particolarmente vigorosa in quanto l'RNA è spesso associato fortemente a proteine. A seguire il trattamento con una soluzione monobasica di fenolo cloroformio e istiocianato di guanidina (TRIzol, Life Technologies). Quest'ultimo reagente viene utilizzato nelle estrazioni di RNA in quanto è un forte inibitore di RNA-asi, nonché un potente denaturante proteico (Wilson et al., 2001). Il fenolo cloroformio è invece utilizzato come liquido organico per le estrazioni.

Si è proceduto poi alla separazione delle fasi centrifugando a 12000 x g per 15 min a 4°C. Viene dunque recuperata la fase acquosa, nella quale sono disciolti gli acidi nucleici (RNA), scartando l'interfaccia, dove si accumulano le proteine denaturate.

La fase acquosa è stata, dunque, trattata con isopropanolo per precipitare l'RNA, che viene recuperato dopo successiva centrifugazione a 12000x g per 10 min a 4°C. A seguire un'ulteriore fase di lavaggio con etanolo 70%, al fine di ottenere una completa precipitazione, e una successiva centrifugazione a 8000x g per 5 min a 4°C. Il pellet è stato risospeso in H<sub>2</sub>O-DEPC.

L'RNA totale così ottenuto, 3 µg, è stato retrotrascritto in DNA complementare.

La retrotrascrizione avviene nella stessa macchina per la PCR impostando dapprima, per 5 min, la temperatura a 70°C, in modo da consentire il completo srotolamento dell'RNA e, successivamente, a 42°C, per 1 ora, fase durante la quale avviene la retrotrascrizione. Nel mix utilizzato sono contenute la trascrittasi inversa Superscript II (Gibco-BRL), dNTP, RNA-asi, H<sub>2</sub>O.

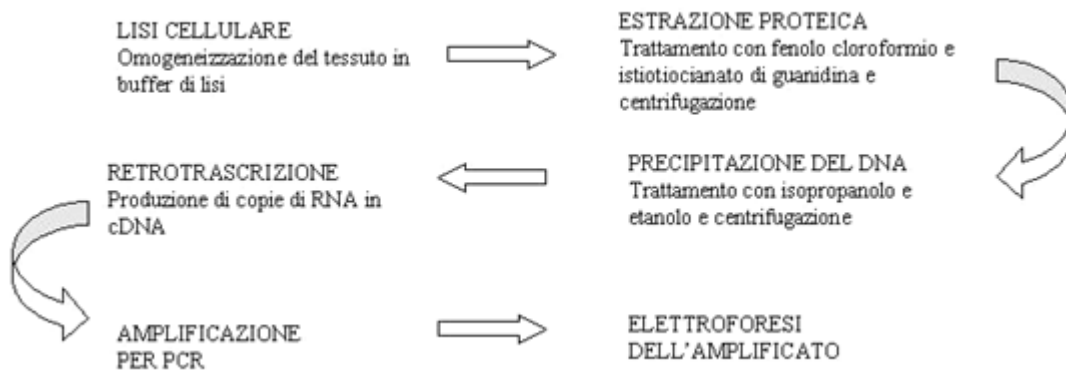
Circa 150 ng di cDNA di ogni campione sono stati amplificati con Taq polimerasi utilizzando primers specifici per i diversi geni, utilizzando l'apparato Thermal Cycler della Perkin Elmer.

Le amplificazioni del cDNA relativo ai diversi trascritti sono svolte in provette differenti, ciascuna contenente uno specifico tipo di primer.

La macchina da PCR è impostata in modo che vari la temperatura nel tempo, facendola rimanere costante per determinati intervalli di tempo. In generale alla temperatura di 95-96°C avviene la denaturazione del duplex, a 56-60°C avviene l'appaiamento con i primer, a 72°C avviene la polimerizzazione (Figura 21).

I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo il cDNA dalla miscela di amplificazione.

I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio ultrapuro (Sepharide) all'1,2 %.



**Figura 21- Tappe dell'estrazione dell'RNA e RT-PCR.**

### 3.4.3- Estrazione delle proteine e Western blotting

L'analisi con Western blotting permette lo studio dell'espressione proteica al fine di poter avere informazioni quantitative, mediante l'analisi densitometrica.

Campioni congelati di tessuto vescicale fresco (sano ospite del tumore e tumorale) sono stati sospesi per 20 min in un buffer di lisi (10% w/v), contenente:

- Triton X-100 1% (solvente)
- TRIS-HCl (pH 7.5) 50 mM (tampone)
- NaCl 150 mM
- EDTA 5 mM (chelante del Ca)
- Aprotinina 75U (inibitore di proteasi)

Le frazioni tissutali sono state omogeneizzate meccanicamente mediante Ultra-turrax T25. L'omogenato è stato centrifugato a 1300 g per 30 min a freddo (4°C) per allontanare i nuclei e i detriti cellulari di maggiori dimensioni. Il sovrantante ottenuto, contenente le proteine, veniva diviso in tante provette più piccole, che possono essere conservate a -20°C senza rischio di denaturazione. Una di queste aliquote è stata utilizzata per

la determinazione della concentrazione proteica del sovranatante. Questo viene fatto mediante l'uso dello spettrofotometro e di uno specifico protein assay reagent (BIORAD). Si è proceduto dapprima alla taratura dello strumento, utilizzando una cuvetta contenente la soluzione di bianco e poi cuvette contenenti concentrazioni proteiche note crescenti, trattate con il reagente, che dà una colorazione diversa a seconda della concentrazione contenuta. Di seguito si è messo il campione nella cuvetta e dal valore di assorbanza ottenuto si estrapola il valore della concentrazione proteica.

Utilizzando un'altra aliquota di sovrinatante si è trattato il campione con sample buffer che contiene un tampone di tris-HCl, SDS (denaturante proteico che carica la proteina srotolata negativamente, in modo uniforme) e blu di bromofenolo (colorante che evidenzia il fronte della migrazione proteica, durante la successiva elettroforesi). Il campione può essere bollito per ottenere la completa denaturazione della proteina.

Utilizzando 80 µg di omogenato tissutale così ottenuto, le proteine sono state separate su gel SDS-PAGE 10% in verticale, in condizioni di riduzione. A tal proposito piccole quantità di campione sono state caricate in pozzetti differenti del gel di poliacrilammide. Questo tipo di gel si compone di un primo tratto, detto gel di impaccamento, e di un secondo tratto, detto gel di corsa. Applicando una differenza di potenziale agli elettrodi del dispositivo elettroforetico, le proteine saranno dapprima impaccate in una sottile banda sul fronte che separa i due tipi di gel; in un secondo momento si separano lungo il gel di corsa, in virtù esclusivamente delle differenze in peso molecolare. La migrazione elettroforetica è stata fermata quando il fronte di blu di bromofenolo ha raggiunto la fine della lastra, indicando l'avvenuta corsa elettroforetica; poiché il colorante migra più velocemente delle proteine, queste si distribuiscono lungo il gel, al di sopra della banda blu.

Le proteine sono state quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento (blott) è ottenuto ponendo il particolare supporto contenente il gel, il filtro di nitrocellulosa e i fogli di spugna e di carta assorbente (sandwich) in una vaschetta con tampone di blott, e applicando una differenza di potenziale. La corrente passa così da una faccia all'altra del supporto, messo in posizione verticale, trasportando le proteine che rimangono adese alla nitrocellulosa.

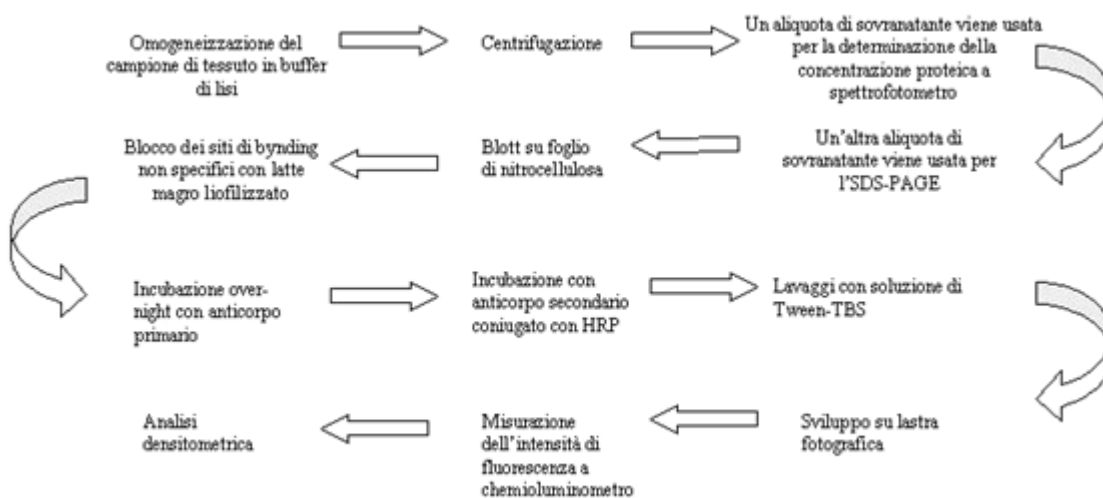
I siti di binding non specifici sono stati bloccati mediante latte magro e liofilizzato (contiene proteine capaci di legarsi specificatamente a quelle bloccate su nitrocellulosa) in una soluzione di Tris-Buffer (TBS) con Tween 20 (0.3%) (Buffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) per 1 ora a temperatura ambiente. Il Tween è un detergente che rimuove l'interazione lì dove il legame non è altamente specifico.

I blots venivano incubati per tutta la notte con gli anticorpi per le varie proteine di interesse.

La soluzione con cui sono stati incubati i blots conteneva, oltre ai rispettivi anticorpi, anche latte magro, meno concentrato, e Tween-TBS. L'interazione con l'anticorpo, così, si stabilisce lì dove il legame sito di binding-anticorpo primario è più specifico rispetto a quello delle proteine del latte (reazione di competizione dove il Tween aiuta il distacco). Di seguito una fase di lavaggio, con soluzione di Tween-TBS, in cui è stato rimosso l'anticorpo primario legato debolmente.

Gli anticorpi legati venivano visualizzati con IgG anti-rabbit o anti-mouse coniugati con HRP. Quindi veniva eseguito un lavaggio con Tween-TBS, per staccare l'anticorpo secondario, dove esso non interagiva col primario.

Dopo incubazione con un substrato della perossidasi, veniva misurata l'immunoreattività in chemiluminescenza (chemiluminometro ECL detection system della Amersham, Buckinghamshire, UK). Dapprima si è proceduto all'esposizione di una lastra fotografica ponendola a contatto con il filtro di nitrocellulosa. Dopo lo sviluppo veniva identificata la banda di interesse, la cui intensità di chemiluminescenza poteva essere misurata con un densitometro (Figura 22).



**Figura 22 - Principali tappe del Western blotting.**

### 3.4.5-PCR trascrittomico mediante arrays a bassa densità (cards microfluidiche)

La rt-PCR (trascrittoma a bassa densità) è stata eseguita utilizzando una card microfluidica di nostra progettazione contenente 48 geni rappresentativi dell'espressione dei fattori di trascrizione HIF1 $\alpha$  e NF $\kappa$ B. I geni contenuti nella Inflammocard sono elencati nella TABELLA 7. (Obiettivo 1)

**TABELLA 7 – Primers contenuti nella Inflammocard (Versione 2010)**

Acronym	Protein or Gene <b>INFLAMMOCARD-2010</b>
18S	Eukaryotic 18S rRNA
ACTB	$\beta$ -actin
AGER	advanced glycosylation end product-specific receptor - RAGE
APCS	amyloid P component, serum

ATN1	atrophin 1 - is responsible for dentatorubral and pallidoluysian atrophy (DRPLA)
CD38	CD38 - ADP-RIBOSYL CYCLASE - Ecto-nicotinamideAdenin- DinucleotideGlycohydrolase
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4 – CXCR4
EGF	epidermal growth factor ( $\beta$ -urogastrone) - EGF
ESR1	estrogen receptor 1 - ER $\alpha$
F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor
FN1	fibronectin 1
GDPH	GAPDH
GP1BA	glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide
GPR84	G protein-coupled receptor 84
GUSB	glucuronidase, beta
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1 – HO1
HPR	haptoglobin-related protein
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor, ICAM-1
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta - IL8R
IRF4	interferon regulatory factor 4 – IRF4
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb - CD41)
ITGB3	integrin, beta 3 (plateletglycoproteinIIIa - CD61)
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (92kDa type IV collagenase) - MMP9
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 – NFkB (p105)
NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes) - iNOS
P2RX7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7 - P2X7
PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide - PDGFR
PTGES	prostaglandin E synthase
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
REL	v-relreticuloendotheliosis viral oncogene homolog - REL
SAA1	serum amyloid A1; serum amyloid A2 – SAA1, SAA2
SELE	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1 – SOCS-1
SOD2	superoxidedismutase 2, mitochondrial
TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)
TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease) – TGF $\beta$ 1
TIMP2	TIMP - metalloproteinase inhibitor 2
TLR2	toll-like receptor 2 – TLR2
TLR3	toll-like receptor 3 – TLR3
TLR4	toll-like receptor 4 – TLR4
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1
VEGF	vascular endothelial growth factor - VEGF

#### 3.4.6- **Statistica.**

Le analisi di espressione genica sono state valutate, paragonando il tumore rispetto al tessuto ospite dello stesso paziente e poi paragonando i carcinomi di basso grado con gli altri diversamente avanzati, inclusi quelli invasivi della parete muscolare. La significatività statistica ( $P < 0.05$ ) è stata calcolata utilizzando il test Mann-Whitney rank sum e il test di Fisher. E' stata eseguita l'analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare l'accuratezza discriminatoria dello stadio T.

## 4.-RISULTATI

### 4.1-Morfologia

I risultati dei referti istologici hanno evidenziato il grado pTa nel 61% dei pazienti, il grado pT1 dell'11% ed il grado pT2 nel 16% (TABELLA 6) (TABELLA 8).

**TABELLA 8: 2017 TNM classification of urinary bladder cancer.**

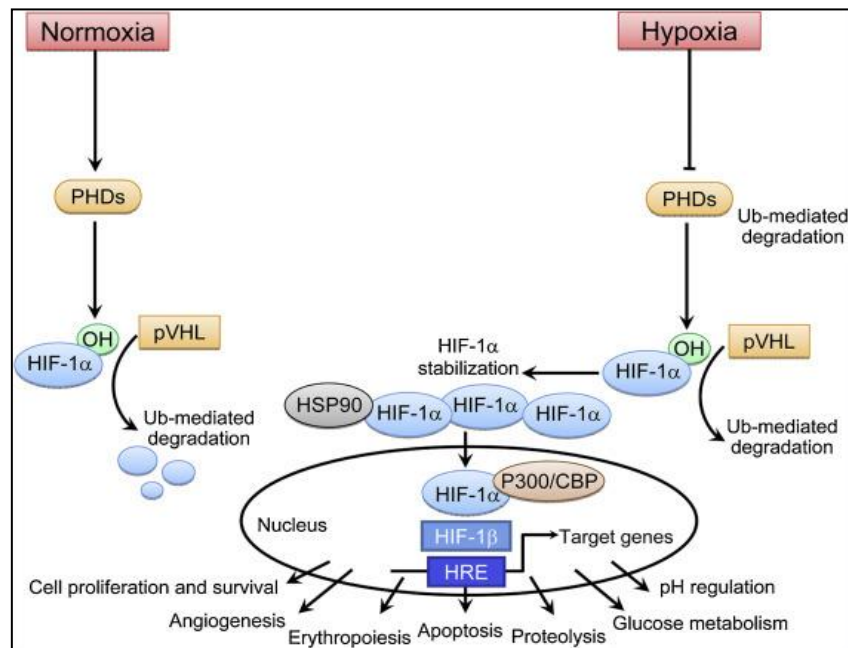
2017 TNM classification of urinary bladder cancer		
<b>T - Primary tumour</b>		
TX	Primary tumour cannot be assessed	
T0	No evidence of primary tumour	
Ta	Non-invasive papillary carcinoma	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : 'flat tumour'	
T1	Tumour invades subepithelial connective tissue	
T2	Tumour invades muscle	
	T2a	Tumour invades superficial muscle (inner half)
	T2b	Tumour invades deep muscle (outer half)
T3	Tumour invades perivesical tissue	
	T3a	Microscopically
	T3b	Macroscopically (extravesical mass)
T4	Tumour invades any of the following: prostate stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall	
	T4a	Tumour invades prostate stroma, seminal vesicles, uterus or vagina
	T4b	Tumour invades pelvic wall or abdominal wall

### 4.2- Espressione di HIF-1 $\alpha$ e sua attivazione.

Per definire la presenza di un microambiente ipossico nel tumore (piuttosto che ricorrere a misurazioni con microelettrodi direttamente impiantati nel tessuto da studiare) abbiamo presupposto che la presenza di HIF1 $\alpha$  e la sua attivazione fossero un marcatore accettabile di microambiente ipossico.

Il Fattore Inducibile dall'Ipossia (HIF1) è un eterodimero composto dalla sub-unità 1 $\beta$  costitutivamente espressa e da una sub-unità 1 $\alpha$  ossigenoregolata. In condizioni di normossia (aerobica), nel citoplasma cellulare, l'HIF-1 $\alpha$  è idrossilata dalla proteina Prolil Idrossilasidominio (PHD). Il complesso interagisce con la

proteina Von Hippel-Lindau (VHL), sottounità di riconoscimento del substrato di una ligasi ubiquitinaproteina che attacca l'HIF-1 $\alpha$  per la degradazione proteosomale. In condizioni di ipossia l'idrossilazione è inibita, HIF-1 $\alpha$  non viene degradato, si accumula nel citoplasma e dopo stabilizzazione trasloca nel nucleo e dimerizza con HIF1 $\beta$ . L'eterodimero interagisce con CBP/p300 e si lega all'elemento regolatore dell'ipossia presente sul promotore di geni indotto dall'ipossia, attivandone la loro trascrizione (Figura 23).

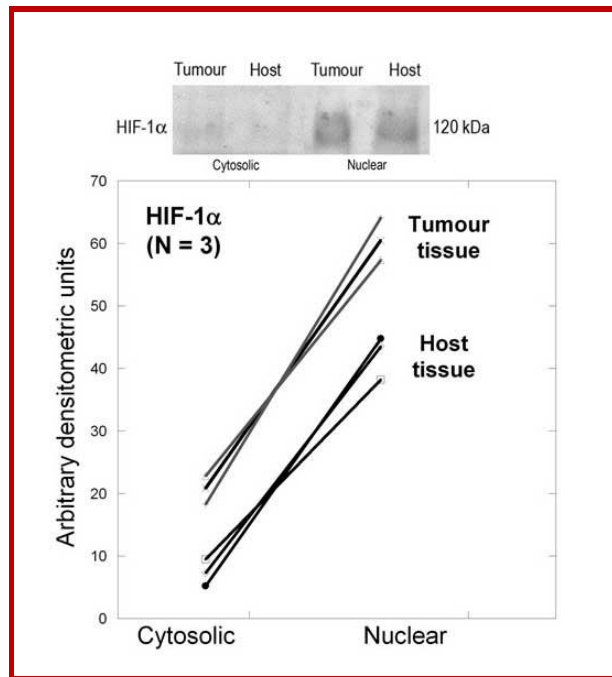


**Figura 23- HIF1 $\alpha$  in condizioni di normossia ed ipossia.**

L'analisi con in rt-PCR e in Western Blotting ha permesso di studiare l'espressione di HIF-1 $\alpha$ , sia nelle frazioni microdissezionate di tessuto tumorale e di tessuto ospite sia, soprattutto, la localizzazione subcellulare per definire la sua attivazione, in estratti nucleari e citoplasmatici dalle frazioni tissutali cellulo-specifiche suddette.

Dalle analisi ottenute si evidenzia una più bassa presenza di HIF-1 $\alpha$  negli estratti citoplasmatici rispetto agli estratti nucleari sia del tessuto ospite che del tessuto tumorale. Osservando il grafico, la proteina appare più abbondante nel tumore rispetto al tessuto ospite. Questo suggerisce una massiccia traslocazione di HIF-1 $\alpha$ , requisito necessario alla sua attivazione (Figura 24). Di conseguenza dimostra un microambiente tumorale ipossico.





**Figura 24 - Attivazione di HIF1 $\alpha$**

### 4.3-Espressione di geni dipendenti da HIF-1 $\alpha$ .

Per dimostrare l'attivazione funzionale di HIF1 $\alpha$  abbiamo studiato l'espressione di alcuni geni tipicamente HIF1 $\alpha$ -dipendenti per la presenza delle specifiche sequenze di consenso nel loro promoter, paragonando il tessuto tumorale a quello ospite, ottenuti per LCMD (TABELLA 10).

#### 4.3.1 -Recettori per le allarmine e VEGFs.

Le allarmine sono segnali di danno che vengono rilasciate da cellule sotto stress, danneggiate o in necrosi/apoptosi; sono molecole intracellulari che espongono i loro pattern chimici all'esterno della cellula danneggiata (TABELLA 9). Vengono riconosciute da specifici recettori normalmente presenti o indotti sulle cellule della risposta infiammatoria/riparativa (leucociti, cellule endoteliali, fibroblasti). Gli stessi recettori possono riconoscere pattern chimici estranei presenti sulla superficie di virus, batteri e altri parassiti e strutture estranee (TABELLA 9).

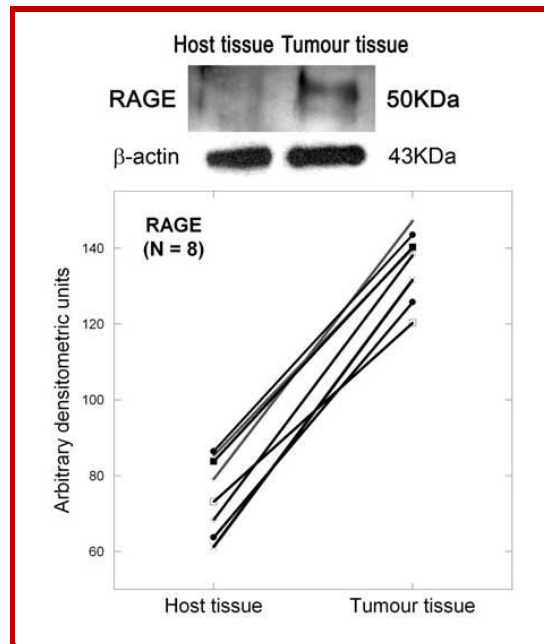
**TABELLA 9 [40]****Alarmins and their receptors activating inflammation.**

<b>Exogenous Alarmins (PAMPs)</b>	<b>Receptors (Ref. 12, 13, 59)</b>
- Viruses	TLR3, TLR7, TLR8, TLR9
- Bacteria	CD14, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TLR11
- Fungi and protozoa	TLR2, TLR4, others
- Obligate Intracellular pathogens	NOD-like receptors (NLRs) and intracellular TLRs
-Intracellular fibers (such as asbestos fibers)	NOD-like receptors (NLRs)
Endogenous alarmins	Receptors
HMGB1	RAGE, TLR2, TLR4
ATP/ADP	P2X7, (other P2X and P2Y receptors?)
Oxidized phospholipids and Phosphatidyl-serine Pattern	TLRs (?)
Crystals (cholesterol, uric acid, etc.)	NOD-like receptors (NLRs) and intracellular TLRs (TLR2, TLR4, CD14)
dsDNA – dsRNA virali citosolici	RIG-like helicases (RLHs), TLR9
Defensins and cathelicidins	TLR4+CCR6, and FPRL1
Heat shock proteins	CD14, CD91, TLR2, TLR4, CD40

PAMPs = pathogen associated molecular patterns; DAMPs = damage associated molecular patterns; TLRs = Toll-like receptors;  
 CCR6 = chemokine receptor 6; FRLP1 = formyl peptide receptor-like 1.

Dai risultati ottenuti appare aumentata la trascrizione dei fattori per la neoangiogenesi (VEGFs o Vascular Endothelial Growth Factors) e quella dei Recettori per allarmine, come RAGE, P2X7, TLR2, TLR3, TLR4 (Figura 35).

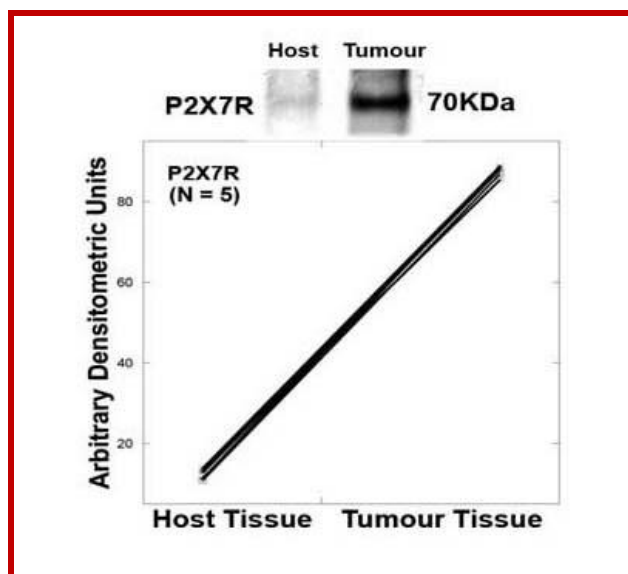
Il recettore RAGE (Receptor for Advanced Glycosilated End-product) è stato scoperto per avere come ligando i prodotti AGEs. Poi si è visto che il suo naturale ligando è la HMGB1, una proteina legata alla cromatina che viene liberata rapidamente prima nel citoplasma e poi, in caso di danno alla membrana plasmatica (necrosi o apoptosi), nello spazio extracellulare. Per questo HMGB1 è uno dei più precoci e affidabili segnali di danno cellulare. Legandosi a RAGE attraverso un pathway che conduce a NFkB, attiva in maniera robusta la risposta immuno-infiammatorio-riparativa. Sotto lo stimolo ipossico, HIF1 $\alpha$  trascrive abbondantemente RAGE nel tessuto tumorale e non nel tessuto ospite (Figura 25).



**Figura 25 – Espressione di RAGE, il recettore per HMGB1, la principale allarmina liberata dalle cellule tumorali danneggiate dall'ipossia.**

Abbiamo valutato un altro recettore per le allarmine: P2X7.

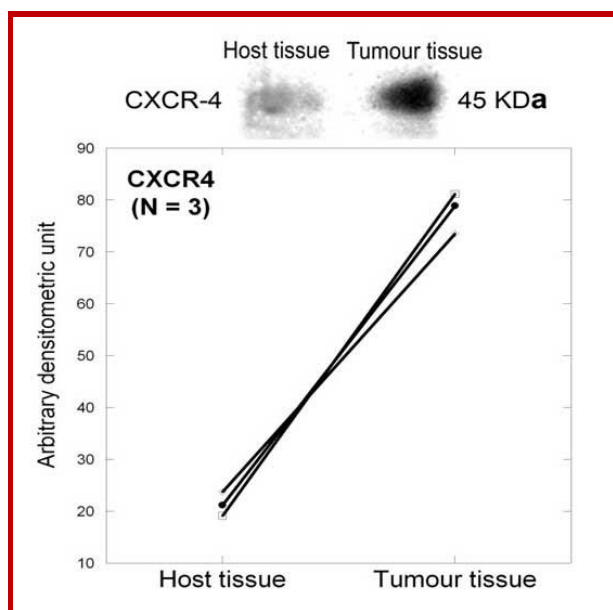
Il recettore purinico P2X7 è ubiquitariamente espresso nei tessuti umani in piccole quantità e lega con alta affinità ATP, ADP; con minore affinità adenina e altri segnali di danno che vengono liberati da cellule la cui membrana plasmatica è stata danneggiata (necrosi o apoptosi). Attraverso un pathway specifico attiva NF $\kappa$ B, contribuendo ad attivare la risposta proinfiammatoria e riparativa. La sua trascrizione può essere ulteriormente indotta in varie condizioni, tra cui l'ipossia sotto il controllo di HIF1 $\alpha$ . Anche questo recettore appare espresso in quantità sostanziali nelle cellule tumorali ipossiche, mentre è assente o molto basso nel tessuto ospite (Figura 26).



**Figura 26– Espressione del recettore P2X7**

#### 4.3.2 – Geni proinfiammatori.

Altri geni di interesse per la progressione tumorale sono sotto il controllo di HIF1 $\alpha$  grazie alla presenza sul loro promoter delle specifiche sequenze di consenso per esso. Tra questi NFkB (p65), il principale fattore di trascrizione per la risposta immuno-infiammatorio-riparativa (Figura 35) e vari recettori per chemochine, come il CXCR4. Il CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) è un recettore proinfiammatorio inducibile, che ha come ligando la chemochina CXCL12 dipendente da NFkB. Questo recettore è responsabile della migrazione delle cellule tumorali e quindi potenzialmente predittivo di malignità. Come si osserva nella Figura 27, CXCR4 si presenta sovraespresso nel tessuto tumorale vescicale rispetto a quello ospite del tumore.



**Figura 27 – Espressione del recettore CXCR4.**

### **4.3.3 - Geni per l'invasione: Metalloproteasi MMP6, MMP9 – Inibitori metalloproteasi TIMP-2.**

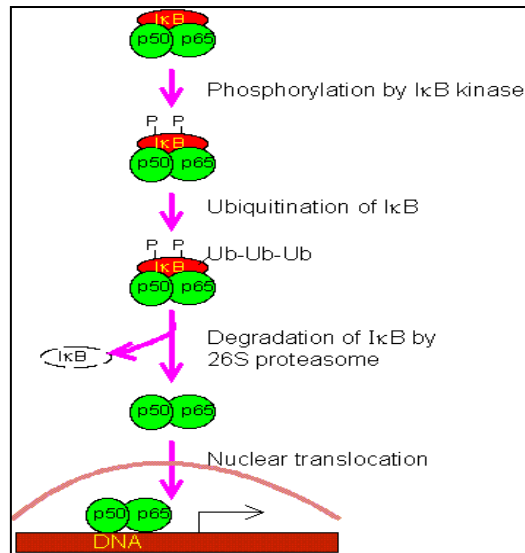
Le metalloproteasi, enzimi che demoliscono componenti della ECM, sono proteine la cui attività è cruciale per l'invasione e le metastasi. Sono costitutivamente espresse, sotto il controllo di NFκB, nei leucociti attivati e in cellule che migrano (cellule embrionali e cellule staminali) e la loro attività è modulata dai TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteases), anche essi normalmente sotto il controllo di NFκB. Tali enzimi possiedono anche sequenze di consenso per HIF1α per cui vengono espresse sotto condizioni ipossiche come mostrato dalle Figure 32 e 35. Successivamente un'espressione aggiuntiva si verifica con l'attivazione di NFκB. Questo è un altro aspetto della reazione integrata dell'asse HIF/NFκB.

### **4.3.4 - Recettori di sopravvivenza: ERα, EGFR**

Il profilo della trascrizione genica dell'adattamento all'ipossia suggerisce che l'asse HIF/NFκB coordina una risposta infiammatoria (difensiva) e riparativa. A quest'ultima si riferisce l'espressione di numerosi fattori di crescita, di sopravvivenza e anche di geni della staminalità, capaci anche di riprogrammare cellule già differenziate (Figura 35). Gli stessi fattori di crescita e di sopravvivenza sono sotto il controllo trascrizionale di NFκB (vedi in seguito).

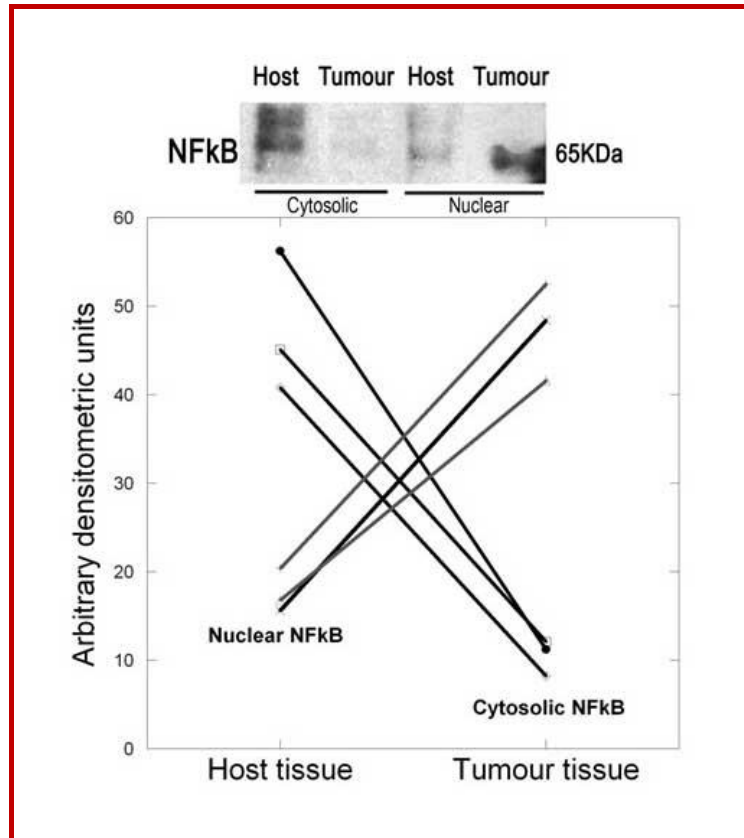
## **4.4-Espressione e attivazione di NFκB.**

NFκB è un fattore di trascrizione che controlla e modula l'espressione dei geni coinvolti sia nella risposta immunitaria innata che in quella adattativa. Con l'attivazione di NFκB, le chinasi IκB prendono di mira gli IκB per la degradazione. Ciò consente a NFκB di traslocare e accumularsi nel nucleo, dove si lega al DNA, determinando l'espressione dei geni bersaglio. Uno dei geni attivati da NFκB è quello che codifica lo stesso IκB. IκB di nuova sintesi si lega a NFκB e attenua il percorso di risposta ai recettori dell'allarmina, creando così un ciclo di feedback negativo all'interno di questo percorso di segnalazione (Figura 28). [40]



**Figura 28-Traslocazione nucleare di NFκB.**

Per valutare l'espressione e l'attivazione di NFκB abbiamo controllato la sua espressione a livello citoplasmatico e nucleare delle cellule tumorali vescicali rispetto a quelle ospite del tumore (Figura 29). Abbiamo osservato una sovraespressione di NFκB solo a livello del nucleo delle cellule tumorali e non in quello del tessuto ospite, come a dimostrare la traslocazione dal citoplasma verso il nucleo e quindi la sua attivazione solo nelle cellule tumorali e non nelle cellule ospite.



**Figura 29 – Sovraespressione ed attivazione di NFκB.**

## 4.5-Espressione di geni proinfiammatori dipendenti da NFkB.

### 4.5.1-Enzimi inducibili: COX2, NOS2.

Numerosi sono gli enzimi inducibili che vengono trascritti quando, nel corso dell'attivazione della risposta infiammatoria, alcuni fattori di trascrizione (tra cui NFkB, STAT-3, e altri) vengono attivati nelle cellule immuno-infiammatorie (incluse le cellule endoteliali e alcuni tipi di fibroblasti). Questo di solito non accade in altri tipi cellulari, mentre si osserva costantemente nelle cellule di tumori progrediti e in cellule staminali tumorali sottoposte a trattamento ipossico, incluse le cellule staminali di carcinoma vescicale, come vedremo in seguito (Figura 35).

Come esempio, abbiamo valutato in campioni di carcinoma vescicale, di vario grado, l'espressione della Ciclossigenasi-2 (COX2) e di entrambe le isoforme (130 e 250 KDa) dell'Ossido Nitrico-Sintasi 2 (NOS2), inducibili, tra quelli maggiormente studiati in altri tumori e trovati associati alla progressione verso la malignità. Questi enzimi contribuiscono alla formazione di nuovi vasi sanguigni, alla differenziazione e crescita cellulare, alla prevenzione dell'apoptosi oltre che al processo infiammatorio. Anche in questo caso i due enzimi inducibili apparivano molto alti nel tessuto tumorale (privo di leucociti CD45+) rispetto al tessuto ospite che, tuttavia poteva contenere alcuni leucociti residenti o reclutati dal tumore stesso. Soprattutto la NOS2, nel tessuto ospite risultava quasi indosabile (Figure 29 e 30).

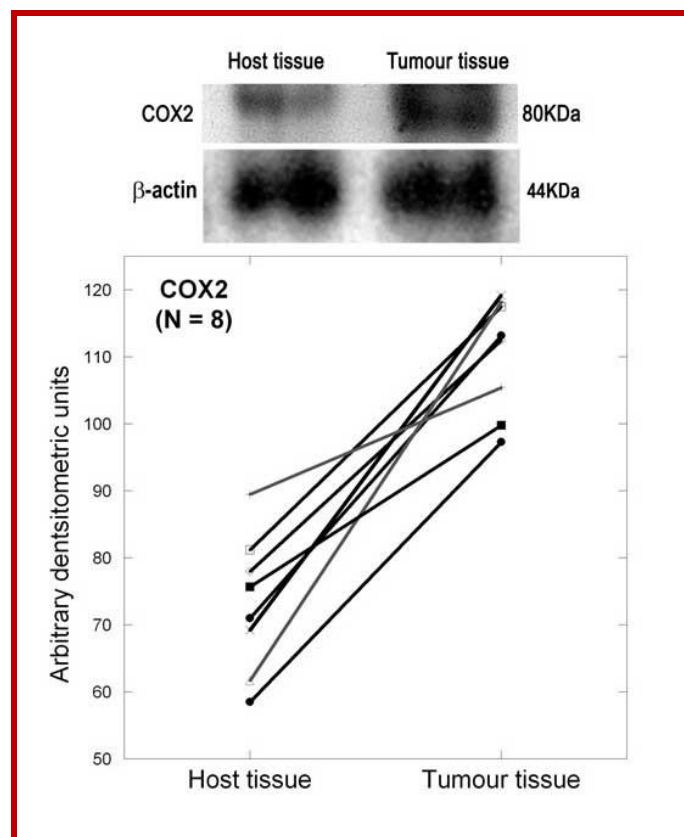


Figura 29 - Espressione della ciclossigenasi inducibile o COX2

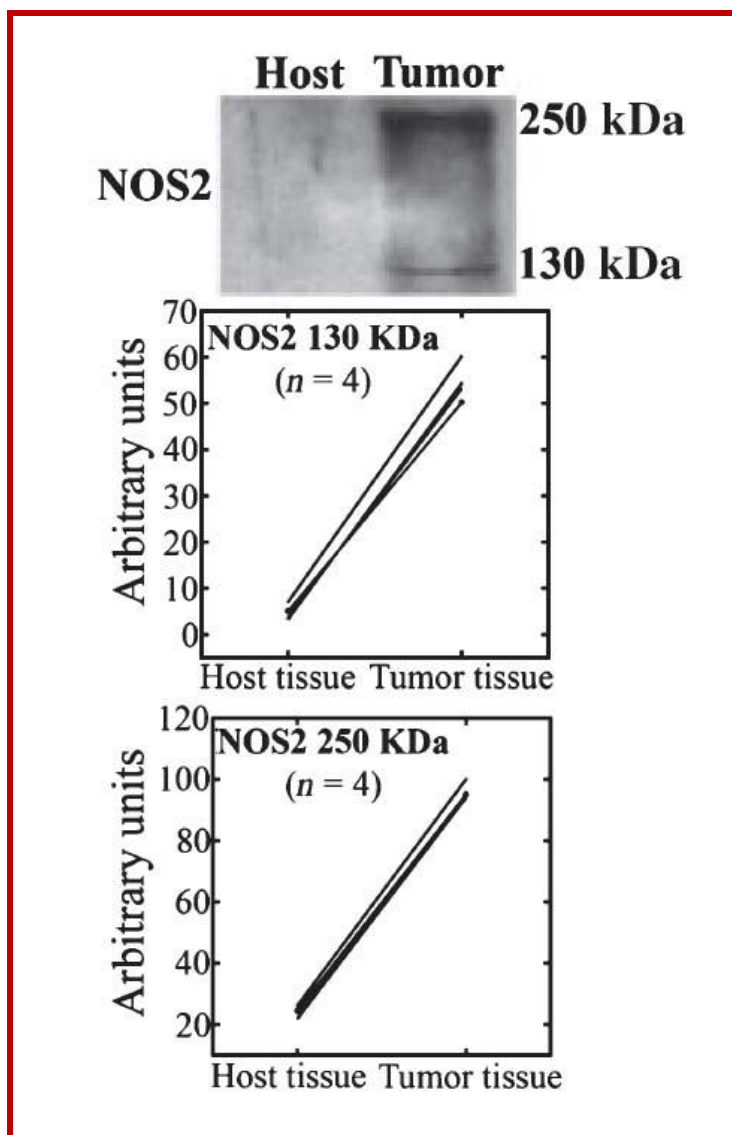


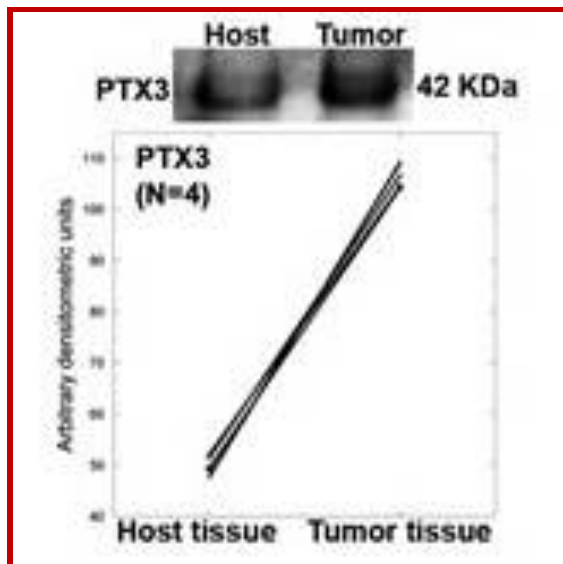
Figura 30 – Espressione delle due isoforme della NOS.

#### 4.5.2 - Proteine di fase acuta: PTX3, SAA.

Le proteine di fase acuta sono fra i marcatori molecolari più attendibili dell'attivazione della risposta infiammatoria. Sono numerose le osservazioni che confermano la loro aumentata espressione nei tumori. Quasi tutti questi studi sono stati fatti su tessuto intero per cui spesso i dati possono apparire contrastanti. La LCMD ha permesso di definire la loro espressione direttamente nelle cellule dei nostri tumori vescicali che, nel caso delle Pentraxine (di cui il principale membro è la PTX3 ma anche la PCR), appare aumentata rispetto al tessuto ospite di vari ordini di grandezza (Figura 31, 34 e 35). La Siero amiloide A (SAA) comprende una famiglia eterogenea di apolipoproteine prodotte principalmente a livello del fegato in risposta al rilascio di citochine da parte dei monociti attivati. Essa è un'importante proteina di fase acuta e i suoi livelli ematici subiscono incrementi anche di 1000 volte in risposta a stimoli lesivi come traumi, infiammazioni, infezioni o neoplasie.



Anche le due isoforme di questa famiglia (SAA1 e SAA2) appaiono sostanzialmente aumentate nelle cellule tumorali ipossiche, mentre non sono espresse in quelle normossiche (Figura 35).

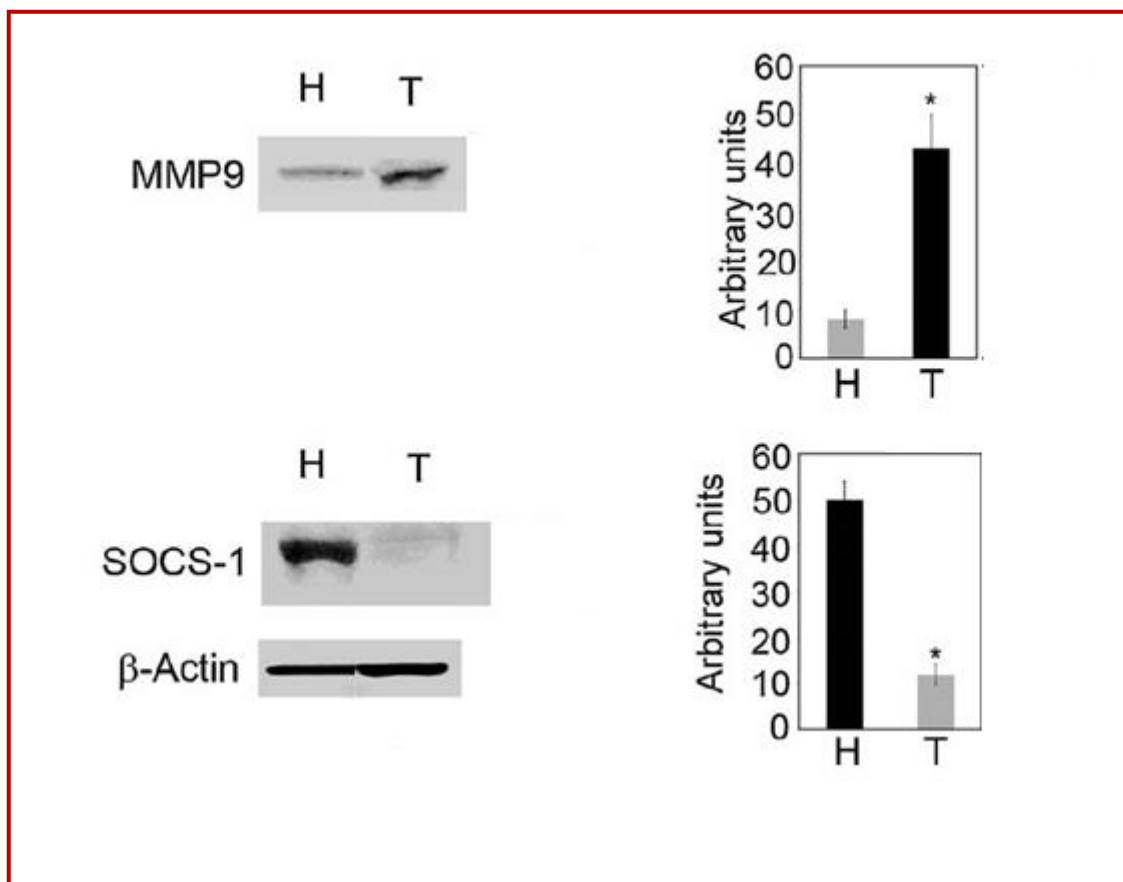


**Figura 31– Espressione di PTX3.**

#### **4.5.3 - Proteine antinfiammatorie: Metalloproteasi MMP9 e proteina antinfiammatoria SOCS-1.**

Vi sono geni che hanno nel loro promoter specifiche sequenze di consenso sia per HIF1 $\alpha$  che per NF $\kappa$ B, per cui vengono espressi sia nella prima fase di adattamento dell'ipossia, sia quando opera il secondo burst di attivazione di NF $\kappa$ B. Tra questi geni la metalloproteasi MMP9 viene sovraespressa nel tumore e non nel tessuto ospite (Figura 32).

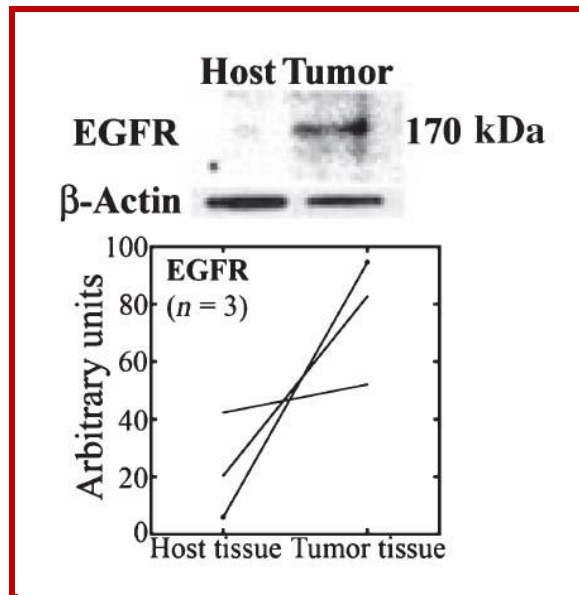
Le proteine della famiglia SOCS (Suppressor of cytokine signaling) fanno parte di un classico sistema di feedback negativo che regola la trasduzione del segnale delle citochine. SOCS1, importante membro della famiglia SOCS, è coinvolto nella regolazione negativa delle citochine attraverso la via JAK / STAT3, inibendo la loro attività chinasi. Vengono così qualificati come efficaci modulatori e regolatori negativi della risposta (Figura 32). In questo caso, il tessuto ospite, in cui HIF1 $\alpha$  è attivato, reagisce con una buona espressione, mentre il tessuto tumorale mostra un'inibizione della trascrizione (Figura 32). Anche se non si conosce con precisione il meccanismo di questa inibizione, si può rilevare che la mancata regolazione negativa nel tumore dà un ulteriore contributo al fenotipo proinfiammatorio/maligno finora descritto.



**Figura 32 – Espressione della Metalloproteasi 9 e di SOCS-1**

#### 4.5.4 - Fattori di riparazione: EGFR, ER $\alpha$

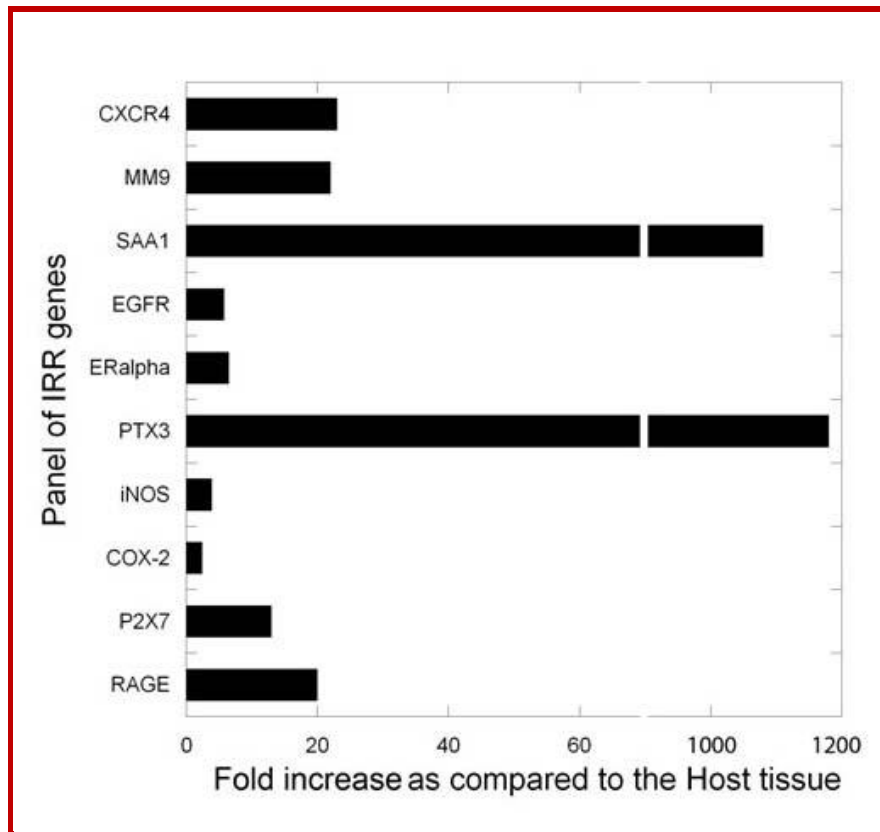
Nell'ambito di questa risposta integrata all'ipossia, fortemente conservata nel corso dell'evoluzione, sono espressi molti geni finalizzati alla riparazione del danno tissutale, mediante fattori di crescita e loro recettori (come EGFR) e fattori di sopravvivenza e loro recettori per le cellule post-mitotiche (come ER $\alpha$ ). Il recettore EGFR (Recettore dell'Epidermal Growth Factor) appartiene ad un gruppo di proteine chiamate recettori tirosin-chinasici, il cui ruolo consiste nel regolare la crescita, la divisione, la sopravvivenza e la morte cellulare. Nelle cellule tumorali, alcune mutazioni a carico del gene EGFR, comportano la trasmissione di un segnale di crescita eccessivo, che si traduce in un'incontrollata proliferazione di tali cellule. Dall'analisi di entrambi i fattori si evince una sovraespressione nel tessuto tumorale al confronto con quello ospite (Figura 33 e 35).



**Figura 33 – Espressione dei recettori per fattori di crescita EGFR**

#### **4.6-Valutazione globale dell'asse HIF/NFkB**

Di particolare rilevanza appare la valutazione globale dei geni trascritti sotto il controllo dell'asse HIF/NFkB effettuata dopo estrazione dell'RNA dalle frazioni microdissezionate di tumori della vescica progrediti di basso/alto grado (Ta, T1 e T2). Nell'array a bassa densità oltre ai geni di controllo (housekeeper) sono stati inseriti i primers dei geni non solo più rappresentativi della risposta biologica integrata all'ipossia, ma anche più significanti per l'acquisizione delle proprietà della malignità. Dall'analisi trascrittomiche ottenuta globalmente mediante la nostra inflammocard appaiono altamente espresse (nei tessuti tumorali) le proteine di fase acuta SAA e PTX3, i recettori per le allarmine RAGE e P2X7, gli enzimi proinfiammatori inducibili iNOS e COX-2, i fattori di crescita e sopravvivenza (ER $\alpha$  e EGFR) e la metalloproteasi MMP9. Come controllo, rispetto al tessuto ospite, basta osservare il valore baseline.



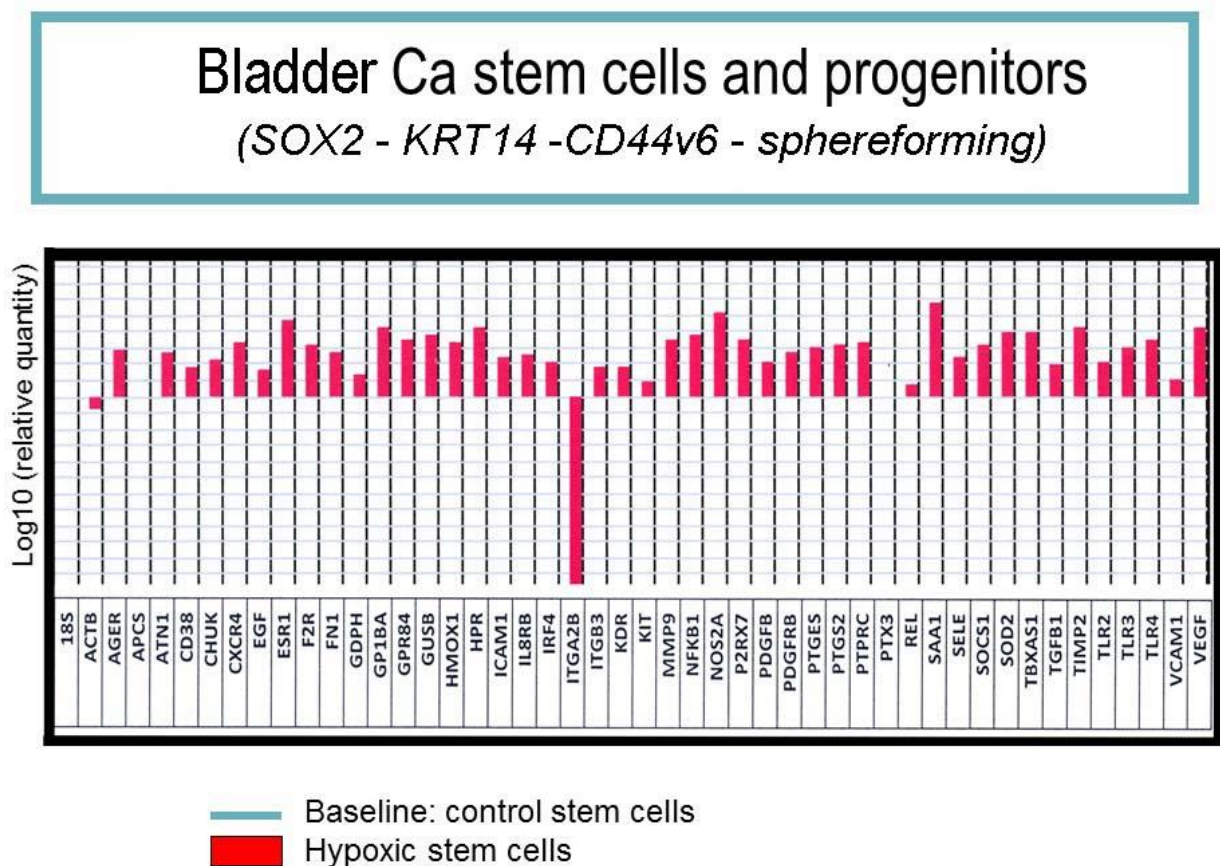
**Figura 34 – Dati estratti dall’analisi trascrittomica ottenuta globalmente mediante la nostra Inflammocard.**

#### **4.7 - Arrays a bassa densità per 48 geni dipendenti da HIF e da NFkB su cellule staminali di carcinoma vescicale.**

Le cellule staminali tumorali (CTS) sono le principali responsabili della crescita tumorale, per la presenza di lunghi telomeri e l’alta attività telomerasica (immortalità). La loro instabilità genomica è responsabile dell’eterogeneità della popolazione cellulare tumorale, soprattutto nei tumori primari e possono differenziarsi secondo l’istotipo del tessuto di origine. Tali cellule crescono in maniera esponenziale dando origine ad aggregati cellulari sferoidali, indicati come “sferoidi”. Le CTS sono resistenti: alla radioterapia per la grande capacità di detossificare i radicali liberi derivati dall’azione delle radiazioni e ai convenzionali chemioterapici per la presenza di specifici trasportatori ABC (12 a domini transmembranacei). Le convenzionali terapie antitumorali risultano inefficaci sulle CTS, per cui la massa tumorale si riduce ma non eradica il tumore. Per questo sono i maggiori responsabili delle ricadute dopo terapia. Solo la conoscenza approfondita della biologia delle CTS potrebbe fornire agenti e strategie adatte ad eliminarle, bloccando la progressione maligna, con sostanziale guadagno della sopravvivenza.

L'identificazione e l'isolamento delle cellule staminali tumorali vescicali sono state ottenute con l'ausilio della citometria a flusso e cell sorter per i marcatori specifici delle CTS vescicali (SOX-2, KRT-14 e CD44v6) dal Prof. Giorgio Stassi dell'Università di Palermo. Per valutare il comportamento delle cellule staminali vescicali in condizioni di ipossia abbiamo eseguito un esperimento, in triplicato. Abbiamo incubato le cellule staminali tumorali vescicali in condizioni di ipossia per 60 minuti; come controllo abbiamo utilizzato le stesse CTS mantenute in condizioni di normossia. Al termine, è stata eseguita un'analisi trascrittómica, ottenuta mediante la nostra Inflammocard.

I risultati ottenuti mostrano un quadro analogo a quello visto nelle frazioni tissutali ottenute con Laser Capture Micro-Dissection, ovvero un aumento dell'espressione genica di tutti i geni HIF/NFkB-dipendenti. Nella Figura 35 la linea di base rappresenta i valori di questi geni in condizioni normossiche mentre le barre rappresentano l'aumento della trascrizione dopo 60 min di incubazione in condizioni di ipossia. (Obiettivo 2)



**Figura 35**–Analisi trascrittómica delle cellule staminali tumorali vescicali in condizioni di ipossia.

#### 4.8 – Controllo della presenza/assenza di leucociti e cellule CD45+.

Per controllo è stata esclusa dai campioni la presenza di infiltrati leucocitari (cellule CD45+ che costitutivamente presentano questi recettori) mediante un Western Blot eseguito su frazioni di LCMD di tessuto tumorale rispetto al controllo positivo di leucociti isolati. Il marcatore CD45+ è presente nel controllo ma non dosabile nell'estratto dal tessuto tumorale (Figura 36).

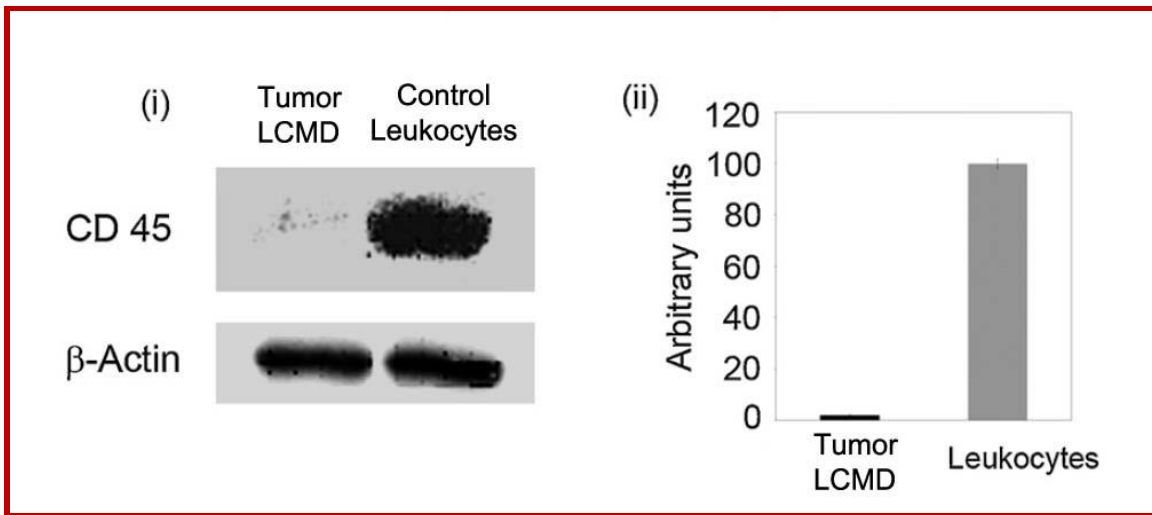


Figura 36 – Controllo per l'esclusione della presenza di cellule CD45+.

## 5.- DISCUSSIONE

### 5.1- Formazione ambiente ipossico.

Come in altri tumori maligni, anche nei tumori vescicali, con il progredire della crescita, si forma un microambiente ipossico dimostrato dall'espressione e dall'attivazione di HIF1 $\alpha$ . In questa tesi è stato dimostrato, mediante rt-PCR e WB su frazioni microdissezionate di tessuto tumorale e tessuto ospite vescicale, che l'espressione di HIF1 $\alpha$  è maggiore nel tessuto tumorale e che, analizzando le frazioni nucleo/citoplasma di quest'ultimo, HIF1 $\alpha$  è prevalentemente traslocato nel nucleo, suggerendo una sua forte attivazione.

### 5.2- Ruolo dei geni HIF1 $\alpha$ -dipendenti nella progressione.

È stato confermato, anche per il carcinoma vescicale, l'espressione di diversi geni dipendenti da HIF1 $\alpha$  che contribuiscono in maniera sostanziale alla progressione tumorale con l'acquisizione di alcune delle tipiche proprietà del fenotipo maligno. Molto importante è stato mettere in evidenza l'espressione dei recettori per le allarmine nel tessuto tumorale e la loro assenza o bassa espressione nel tessuto ospite. Per controllo è stata esclusa dai campioni la presenza di infiltrati leucocitari (cellule CD45+ che costitutivamente presentano questi recettori) mediante un controllo di WB eseguito su frazioni di LCMD di tessuto tumorale.

La TABELLA 10 riassume i geni dipendenti da HIF1 $\alpha$  ritrovati espressi in vari tumori umani, incluso il carcinoma vescicale, il loro specifico ruolo nell'acquisizione delle proprietà della malignità e le principali referenze bibliografiche dove è stato studiato il loro preciso ruolo nella progressione [56].

**TABELLA 10 – Principali geni HIF1 $\alpha$ -dipendenti responsabili delle caratteristiche della malignità [56]**

Adaptation to hypoxia in transformed (stem) cells.		
Genes and molecules activated by HIF1 $\alpha$	Biological adaptation toward malignant phenotype	Reference
1 VEGFs and VEGFRs	Neoangiogenesis	Ahluwalia and Tarnawski (2012)
2 TERT	Increase in telomere length and proliferative potential	Guan et al. (2012)
3 c-Myc; cyclin D1	Increased proliferation	Fer and Melillo (2011), Zhu et al. (2010)
4 TERT, OCT4, Notch	Stem cell renewal	Lee et al. (2012), Qiang et al. (2012)
5 ABC transporter	Drug resistance	Maugeri-Saccà et al. (2011)
6 ALDA, PGK, GLUT-1	Changes in energy metabolism	Mucaj et al. (2012), Semenza et al. (1996), Lam et al. (2009)
7 CXCR4...	Motility	Lu and Kang (2010)
8 MMP9	Integrity of basement membrane, invasivity	Choi et al. (2011b)
9 Alarmin (DAMPs) receptors	NFkB activation; IRR gene expression	Tafari et al. (2011a)

### **5.3- Attivazione di NFkB associata agli effetti dell'ipossia.**

Abbiamo dimostrato una sovraespressione di NFkB mediante rt-PCR e WB ed una sua forte attivazione con la dimostrazione della sua prevalente traslocazione nel nucleo nelle frazioni nucleo/citoplasma, paragonando le frazioni ottenute dal tessuto ospite con quelle ottenute dal tessuto tumorale. Noi riteniamo che questa forte attivazione sia dovuta all'attivazione dei recettori per le allarmine (espressi sotto il controllo di HIF1 $\alpha$ ). L'attivazione è dipendente dalle allarmine rilasciate dalle cellule disorganizzate dalla necrosi dove maggiore è stata l'assenza/diminuzione dell'ossigeno. Non abbiamo ancora misurato i livelli di queste allarmine nei tumori vescicali, ma per altri tumori (mammario, glioblastoma), il loro rilascio in ambiente ipossico è stato dimostrato con l'aumento di HMGB1 (ligando per RAGE), dell'ATP/ADP/Adenina (ligandi per P2X7), di acidi nucleici liberi (ligandi per vari recettori Toll-like) e con la presenza di detriti di membrane che espongono la fosfoetanolamina (ligando per il recettore TLR-3 da noi dimostrato overespresso nel carcinoma vescicale, (Figura 35).

### **5.4- Ruolo dei geni NFkB-dipendenti nella progressione.**

Abbiamo dimostrato nei tumori vescicali più avanzati l'espressione di numerosi geni proinfiammatori nelle cellule tumorali stesse; questi geni contribuiscono con la loro funzione a evidenziare il fenotipo maligno. Normalmente questi geni sono espressi dai leucociti attivati e dipendono anche in questo caso dall'attivazione di NFkB. Nel nostro studio è stata costantemente controllata l'assenza di cellule leucocitarie (CD45+) in maniera da eliminare questo fattore confondente e poter attribuire questa espressione alle cellule tumorali stesse. In lavori precedenti del gruppo con cui ho lavorato è stato anche chiaramente dimostrato mediante immunohistochimica che le proteine codificate da questi geni proinfiammatori sono localizzati nelle cellule tumorali, mentre sono assenti o solo presenti in scarse quantità nelle cellule del tessuto ospite o tessuto normale. [55][43][39]

Nella TABELLA 11 sono elencati i principali geni trascritti sotto il controllo di NFkB, anche essi responsabili dell'acquisizione di varie caratteristiche della malignità.



**TABELLA 11 - Principali geni NFkB-dipendenti responsabili delle caratteristiche della malignità [56]**

IRR gene expression and malignant phenotype biological properties.

N	IRR gene families dependent on NFkB	Biological functions leading to malignant phenotype	Reference
1	MMPs and TIMPs	Digestion of basement membrane and ECM; invasion	Tobar et al. (2010)
2	Adhesion molecules and counter-receptors	Detachment; homing; organ/tissue tropism; metastatic pattern	Marcu et al. (2010)
3	Chemokines and their receptors	Migration; homing; metastatic patterns	Lu and Kang (2010)
4	Inducible enzymes (COX2; iNOS)	Extravasation, migration, angiogenesis	Wang and Dubois (2006)
5	Cytokines and their receptors	Local amplification of IRR, proliferation, and survival	DiDonato et al. (2012)
6	VEGFs and VEGFRs	Angiogenesis	Ono (2008)
7	Growth and survival factors	Proliferation; antiapoptosis	Langley and Fidler (2011)
8	Acute-phase proteins	IRR amplification; chemotaxis; repair; DAMPs	Hiratsuka et al. (2008)
9	SOCS	Negative regulation of IRR; antimetastatic	Strebovsky et al. (2012)
10	Nm23	Cytoskeletal regulation and organization	Liu et al. (2011)

È da notare come molti dei geni proinfiammatori sono anche sotto il controllo trascrizionale di HIF1 $\alpha$  e contribuiscono in maniera sinergica a varie caratteristiche della malignità [56].

### 5.5- Le cellule staminali isolate dal carcinoma vescicale rispondono all'ipossia attivando l'asse HIF/NFkB.

Le cellule staminali, sia normali che tumorali, costituiscono il compartimento con maggiore plasticità per rispondere ai modificatori biologici per cambiare anche drasticamente il loro fenotipo, nel corso di adattamento alle mutate condizioni fisiologiche e sotto la spinta di agenti dannosi, come l'ipossia.

Con l'unico esperimento (in triplicato) che abbiamo potuto eseguire sulle cellule staminali isolate da carcinoma vescicale uroteliale umano (gentilmente fornite dal prof. Giorgio Stassi dell'Università degli Studi di Palermo) abbiamo confermato che esse rispondono in maniera sostanziale all'attivazione dell'asse HIF/NFkB dopo incubazione in ipossia per 60 min. Infatti, aumentano tutti i geni HIF/NFkB-dipendenti presenti nella nostra Inflammocard. Alcuni di questi risultati sono stati controllati anche da WB. Questo ha confermato anche quanto è stato visto nelle cellule staminali di altri tumori, come il carcinoma prostatico [41], il carcinoma mammario [54] ed il glioblastoma [55] dal gruppo di ricerca con cui ho collaborato.

Questi risultati nelle cellule staminali tumorali appaiono ovvi considerata la potenziale maggiore trascrivibilità della cromatina delle cellule staminali, poco aggregata, poco spiralizzata e scarsamente bloccata da proteine cromatiniche e cromosomiche, mentre nelle cellule differenziate questi stessi meccanismi di blocco possono inattivare ampie zone del genoma, impedendone la trascrizione.

## **5.6- Valutazione globale dell'asse HIF/NFκB nella progressione maligna: Risposta Integrata all'Ipossia.**

Questi risultati presi nella loro globalità suggeriscono fortemente che, in un tumore iniziale, la progressione verso il fenotipo maligno è un fenomeno complesso al quale contribuiscono almeno tre fattori, dei quali due intrinseci al tumore stesso e uno estrinseco, legato alle modificazioni del microambiente del tessuto ospite:

- a) La reazione adattativa al microambiente ipossico formato nel corso della crescita delle cellule trasformate fino a un tumore le cui dimensioni superano la capacità di diffusione dell'ossigeno e dei substrati dai/verso i vasi (circa 200 μm).
- b) Le mutazioni accumulate nei geni di questa risposta adattativa, specialmente quando vi è perdita di funzione dei geni della riparazione del DNA. Ognuno di questi geni fornisce un piccolo/grande contributo alla caratteristica nel quale è coinvolto, accorciando i tempi di progressione.
- c) Un contributo esogeno alla progressione viene dato da fattori esterni che possono facilitare le varie tappe della progressione, età, sindrome metabolica, fattori endocrini, ecc.

## **5.7- Implicazioni diagnostiche e prognostiche**

Le conoscenze che si vanno accumulando su questi aspetti della patogenesi della progressione maligna permettono di innovare in maniera sostanziale il campo della diagnosi precoce e non invasiva, la precisa valutazione prognostica, il reale grado di progressione e la predittività di recidiva e di quadro metastatico.

Ormai si conoscono molti marcatori molecolari rilevabili nei liquidi organici (sangue, urine, liquido cefalorachidiano, saliva, essudati, ecc.), nei campioni tissutali (biopsie e campioni chirurgici) e nelle singole cellule tumorali circolanti (single-cell analysis). Tuttavia, nonostante il grande lavoro di ricerca alla base di queste conoscenze, abbiamo ancora la necessità di giungere a una sicura validazione clinica.

In letteratura l'aumento dell'attività delle Metalloproteasi (6-9), la perdita di funzione di TIMP-1/2, l'aumento dell'espressione di e-caderine e di CXCR4, sono tutti riferiti come segni prognostici negativi predittivi di metastasi.

La dimostrazione che nel tumore vescicale vengono attivati sia i geni per l'invasione che quelli per la migrazione significa che le cellule del tumore primitive sono adatte a lasciare il tessuto, extravasare e migrare fino al sito di richiamo e/o di homing, anche se l'istopatologo riferisce un quadro di carcinoma dell'urotelio di basso grado, non infiltrante.

Il follow-up standard dei pazienti affetti da neoplasia vescicale dopo TURB (Trans-Uretral Resection Bladder), con stadio pTa/ pT1 di basso grado è di eseguire una Uretrocistoscopia e Oncocitologia urinaria (su 3 campioni

di urine), a distanza di 3 mesi dall'intervento chirurgico. Da qui l'utilità dell'analisi mediante un array a bassa densità per una migliore definizione della prognosi e prevenzione della recidiva con un follow-up mirato.

### **5.7.1- Biomarcatori diagnostici.**

- Biomarcatori per la Trasformazione:

Il veloce progresso di alcune metodiche di analisi biologica, specialmente quelle trascrittomiche, e l'accuratezza e rapidità del sequenziamento degli acidi nucleici e delle proteine, ha permesso l'identificazione di centinaia di geni mutati, coinvolti nella trasformazione di cellule normali in cellule tumorali, con la perdita del controllo della proliferazione e dell'apoptosi e dell'efficienza nella riparazione del DNA. Alcuni di essi sembrano essere specifici per tessuti e organi, ma la maggior parte sono comuni a tutti i tumori. Inoltre, l'identificazione di pathways e funzioni comuni alterate (perdita del controllo della proliferazione, perdita del controllo dell'apoptosi e alterazione dei diversi meccanismi di riparazione del DNA e cromosomi) ha confermato la comune base mutazionale per la fase di trasformazione tumorale. Tuttavia, nelle TABELLE 10 e 11 sono elencati gli oncogeni e i geni oncosoppressori più frequentemente/specificamente ritrovati nel carcinoma vescicale. Questo aspetto ha avuto traslazione nella clinica per la diagnosi e la terapia. Mediante arrays a bassa densità per i geni del carcinoma vescicale è possibile avere rapidamente il quadro mutazionale nel singolo paziente e la rapida conferma delle mutazioni mediante il sequenziamento con gli apparati di NGS (Next Generation Sequencing). Questa precisazione diagnostica permette di predire l'effetto di farmaci biologici (in genere anticorpi monoclonali) specifici per quei prodotti oncogenici mutati. Nel caso di geni oncosoppressori è stato anche possibile riattivare proteine (es. p53) inibite da agenti esogeni, come proteine virali oncogene.

- Biomarcatori per la Progressione:

I microarrays sono stati utilizzati per avere un quadro completo mutazionale del singolo tumore. Ogni volta sono stati identificati pool di geni mutati coinvolti normalmente nella risposta integrata dell'asse HIF/NFκB.

La definizione del ruolo dell'asse HIF/NFκB nella progressione maligna anche del carcinoma vescicale, analizzata in questa tesi, suggerisce che un array a bassa densità (contenente 48-96 geni opportunamente selezionati tra le varie famiglie geniche dimostrate coinvolte nell'acquisizione delle caratteristiche della malignità) può definire la progressione di un tumore e, pertanto, dare una base molecolare e meccanicistica alla stadiazione di un tumore, indipendentemente dal grado istologico.

Inoltre, l'identificazione dei geni coinvolti nella progressione del singolo tumore permette di agire sia sul pathway HIF/NFκB, che sugli specifici geni (mutati o attivati) coinvolti nella progressione.

- Altri biomarcatori: MicroRNA. Vari miRNA che hanno geni bersaglio quelli da noi identificati come geni della "progressione", possono essere valutati e avere un valore diagnostico/prognostico simile a quello visto per gli arrays da noi suggeriti.

### **5.7.2- Biomarcatori prognostici e predittivi di recidiva.**

La selezione di un opportuno pool di geni della risposta integrata HIF/NFκB, che sono stati dimostrati essere coinvolti nell'invasione e nella genesi delle metastasi può essere utile per definire la prognosi del carcinoma vescicale e predire la recidiva dopo TURB. In letteratura, l'aumento dell'attività di MMP9-6, la perdita di funzione di TIMP-2, l'aumento dell'espressione di e-caderine, di CXCR4, la perdita di funzione di nm-23 per il controllo del citoscheletro, l'espressione di controrecettori per homing su cellule endoteliali e altre cellule mesenchimali, sono tutti riferiti come segni prognostici negativi predittivi di metastasi. L'analisi del loro insieme mediante un array a bassa densità aumenta di molto la predittività di questi marcatori.

### **5.7.3- Quadro immuno-infiammatorio associato alla formazione delle metastasi.**

È noto agli istopatologi che sia il tumore che il tessuto peritumorale possono essere infiltrati da leucociti di vario tipo. La composizione dell'infiltrato è stata correlata con un diverso significato prognostico: la presenza prevalente di linfociti, NK e macrofagi ha suggerito una risposta immune contro il tumore e questo assume un significato prognostico positivo, mentre la prevalente presenza di polimorfonucleati neutrofilici, eosinofili e basofili indicherebbe un processo infiammatorio acuto con abbondante produzione di radicali e, quindi, con attività di promozione e progressione del tumore stesso.

Oggi questa visione semplicistica va reinterpretata alla luce delle nuove conoscenze. Gli infiltrati leucocitari nel tumore sono formati da cellule residenti e, soprattutto, da cellule reclutate dal circolo attraverso due possibili meccanismi: il primo legato a una fisiologica attivazione delle cellule residenti che possono liberare mediatori con attività chemiotattica, il secondo legato alla progressione delle cellule trasformate HIF/NFκB indotta, capaci di produrre e liberare gli stessi mediatori inducibili (es. iNOS, COX-2 e citochine varie) e specifiche chemiochine (famiglia CXCL e SDF1), linfocine e fattori di migrazione vari.

È noto, anche, che la fisiologica risposta infiammatoria può avere caratteristiche diverse a seconda delle cellule coinvolte, delle citochine e mediatori prodotti e delle chemiochine da cui dipende (TABELLA 12) e dagli stimoli iniziali che l'hanno indotta. Questa distinzione è apparsa evidente per prima nei linfociti T helper e poi in tutti gli altri componenti coinvolti, per cui i due tipi di risposta sono stati chiamati Th1 e Th2. Le caratteristiche delle risposte Th1 e Th2 sono riassunte nella TABELLA 12.

È interessante notare che un'analisi accurata dell'espressione proinfiammatoria delle cellule tumorali indotta dall'attivazione dell'asse HIF/NFκB appare molto simile a una risposta Th1 o risposta cellulo-mediata: le cellule tumorali producono soprattutto citochine Th1, rispondono con la migrazione alle chemiochine e ai fattori chemiotattici per linfociti, NK e macrofagi e producono mediatori con la stessa cinetica della risposta Th1. Inoltre, nel tessuto tumorale richiamano soprattutto linfociti, macrofagi, NK e cellule dendritiche. Infine, la loro risposta migratoria del tumore primitivo all'homing per la metastasi è prevalentemente legata a stimoli

periferici di tipo Th1. Esistono studi epidemiologici di stretta associazione tra presenza di malattie autoimmuni tessuto/organo specifiche (Th1) e maggiore rischio e gravità del quadro metastatico.

**TABELLA 12 – Caratteristiche della risposta cellulo-mediata (Th1) e umorale (Th2).**

<i>Caratteristiche Th1</i>	<i>Caratteristiche Th2</i>
<b>Cellule</b>	
Natural killer	Granulociti neutrofil
Cellule dendritiche	Granulociti basofili
Macrofagi	Granulociti basofili
Linfociti	Linfociti
<b>Citochine</b>	
IFN- $\gamma$ – IL-12	IL-4 – IL-5 – IL-10
IL-1, IL-6	IL-1, IL-6
TNF, MIF	TNF, MIF
M-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF	(M-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF)
<b>Chemochine</b>	
Macrophage-Derived Chemokine (CCL22)	Eotaxina (CCL11)
Viral macr. Inhib. protein (vMIP, CC)	Interleuchina-8 (CXCL8)
CCL4 – SDF-1	B-cell attracting (BCA-1 o CXCL13)

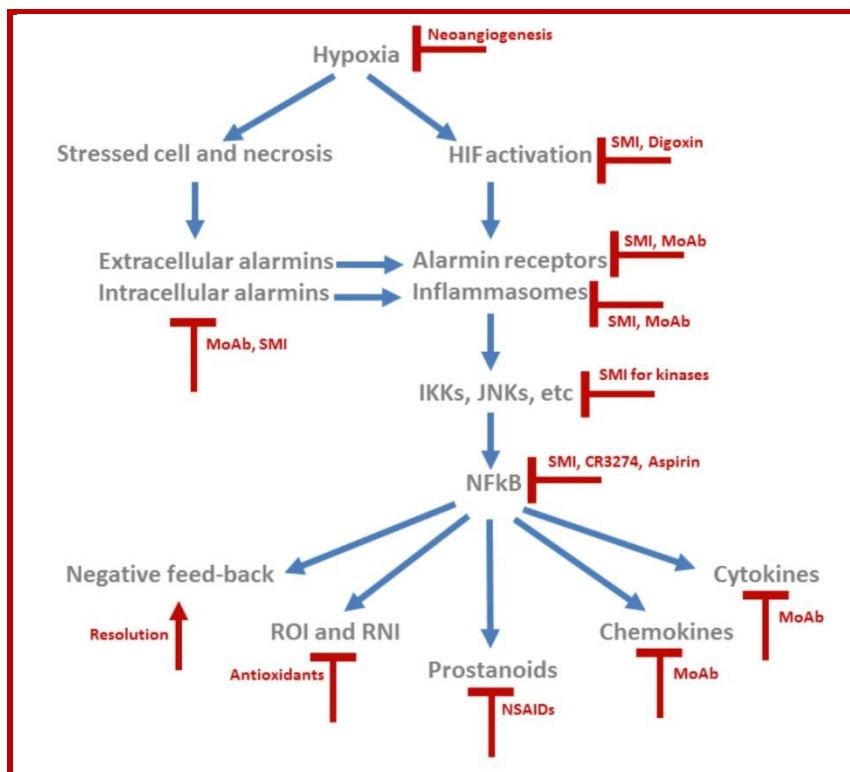
Infine, il quadro dovrà comunque essere analizzato in relazione ai cloni linfocitari, macrofagici e dendritici per individuare quelli comunque associati ad una possibile risposta dell'organismo ad antigeni tumorali stabili e capaci di evocare una risposta immune di tipo cellulare.

## 5.8- Identificazione di possibili bersagli terapeutici

Numerosi studi epidemiologici e vari trials clinici controllati supportano l'idea che la modulazione negativa dell'asse HIF/NF $\kappa$ B riduca l'incidenza (e la manifestazione clinica) di alcuni tumori e la loro progressione maligna con invasione e metastasi clinicamente evidenti.

Notevoli sono gli studi epidemiologici e alcuni studi clinici controllati sugli effetti dell'aspirina a basse dosi sull'incidenza di alcuni tumori (carcinoma del colon, ca mammario e tumori testa/collo), sul rallentamento della progressione e sull'aumento della sopravvivenza.

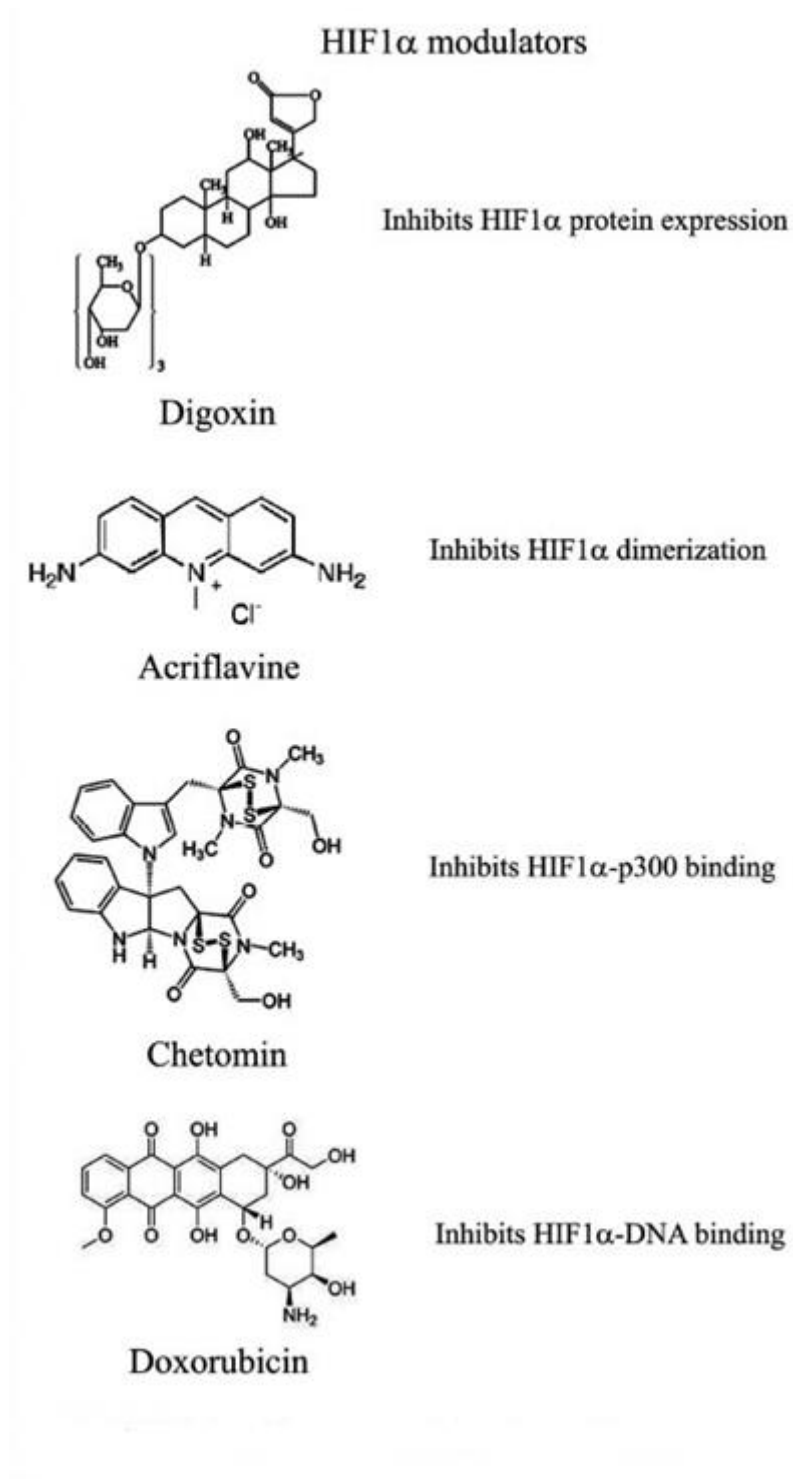
Attualmente, numerose molecole (Figura 37), che inibiscono o modulano negativamente HIF1 $\alpha$ , NFkB o i geni da essi dipendenti, sono oggetto di studio e di trials clinici controllati per definire la loro validità clinica nella terapia dei tumori e, in particolare, nell'inibizione dell'invasività, nella formazione delle metastasi con un sostanziale guadagno della sopravvivenza. È interessante notare che alcune di queste molecole sono farmaci già utilizzati in clinica e, pertanto, utilizzabili nella terapia contro i tumori con modalità off-label.



**Figura 37 – Possibili target terapeutici di inibizione dell'asse HIF/NFkB. - SMI = small molecule inhibitors; MoAB = anticorpi monoclonali; NSAIDs = Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs.**

### 5.8.1-Inibitori e modulatori di HIF1 $\alpha$ .

Tra gli inibitori di HIF1 $\alpha$  va ricordato la digitale che, a dosi terapeutiche, ha dimostrato attività antiprogredione in vari tumori solidi, inclusi il carcinoma prostatico, mammario e polmonare. Non vi sono studi relativi al suo utilizzo nel carcinoma vescicale. Molte altre molecole sono state prese in considerazione, numerosi loro derivati e varie nuove piccole molecole (small molecule inhibitors), capaci di inibire i due fattori di trascrizione oppure direttamente i geni da loro espressi. Nonostante i numerosi trials clinici in corso, ancora non vi sono definitive evidenze cliniche per abbandonare le tradizionali strategie per questi nuovi suggerimenti forniti da queste analisi molecolari (Figura 38).



**Figura 38 – Alcuni composti inibitori di HIF1 $\alpha$**

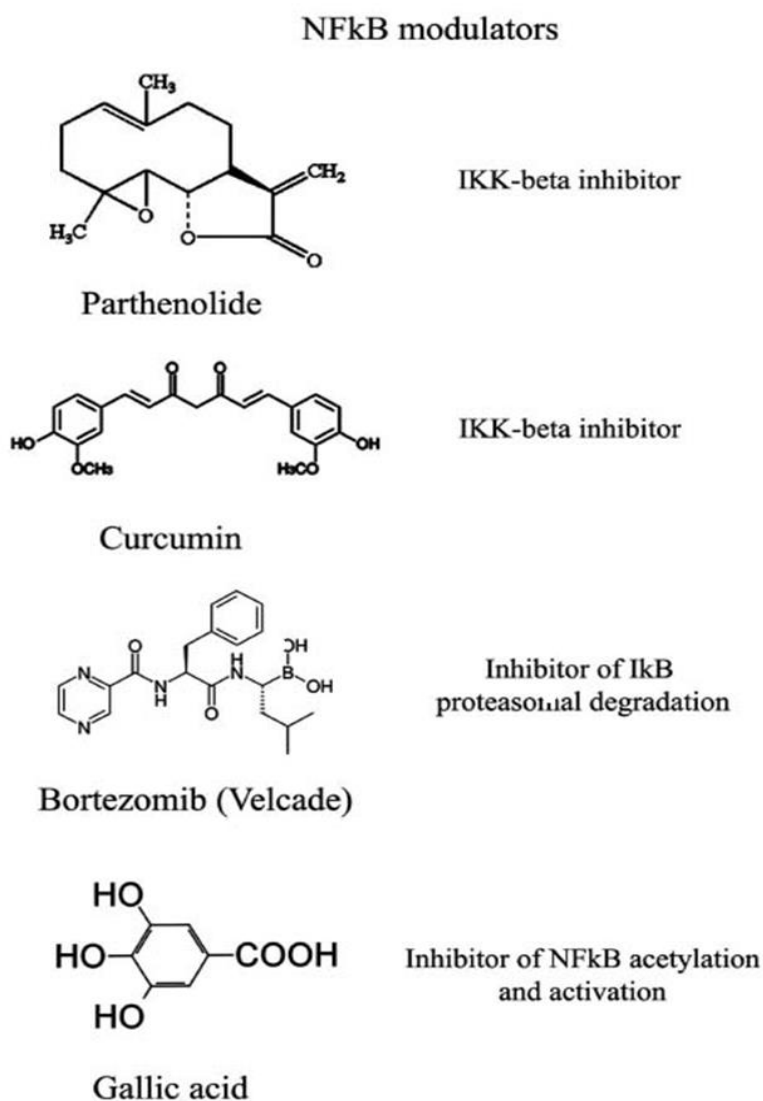
### 5.8.2- Inibitori e modulatori di NF $\kappa$ B.

Spegnere l'infiammazione, soprattutto se prolungata e/o cronica, si è rivelata una strategia efficace per prevenire i tumori, rallentare la progressione e aumentare la sopravvivenza. La pubblicazione dei dati di diversi studi epidemiologici e clinici sugli effetti dell'aspirina sull'incidenza e sulla progressione di vari tumori, ha

stimolato la ricerca di nuovi farmaci capaci di agire su vari componenti della risposta infiammatoria e in particolare sui fattori di trascrizione che la governano, soprattutto NFκB e STAT3.

La stessa aspirina non solo inibisce l'attività della ciclossigenasi, ma è anche un moderato inibitore di NFκB. Curcumina, Partenolide, Acido Gallico inibiscono con meccanismi diversi, ma con efficacia maggiore rispetto all'aspirina.

Inibitori di vari geni proinfiammatori, controllati da NFκB, si sono dimostrati efficaci anche sui tumori e la loro progressione. Anche per NFκB come per HIF1α sono in corso di studio clinico numerose piccole molecole, identificate dai chimici farmaceutici mediante studi di strutturistica molecolare, e alcuni anticorpi monoclonali (Bortezomib) che inibiscono la degradazione proteasomica di IκB regolatore negativo di NFκB (Figura 39).



**Figura 39 – Alcuni composti modulatori di NFκB.**



### 5.8.3- Modulazione della risposta immune e controllo di altri fattori del microambiente.

Recentemente l'attenzione si è rivolta all'attività delle cellule della risposta immune contro i tumori, incluso il carcinoma vescicale. [56] Di particolare rilevanza sono gli inibitori di PDL1 e PDL2 e, soprattutto di CTLA4 capaci di determinare una forte attivazione della risposta immune contro il tumore [35] [45] (Figura 40 e 41). Ad esempio, è stato proposto l'Atezolizumab come trattamento di prima linea nel carcinoma vescicale metastatico, con elevata espressione di PDL1, non responsivo alla chemioterapia convenzionale; ma ulteriori studi sono necessari.

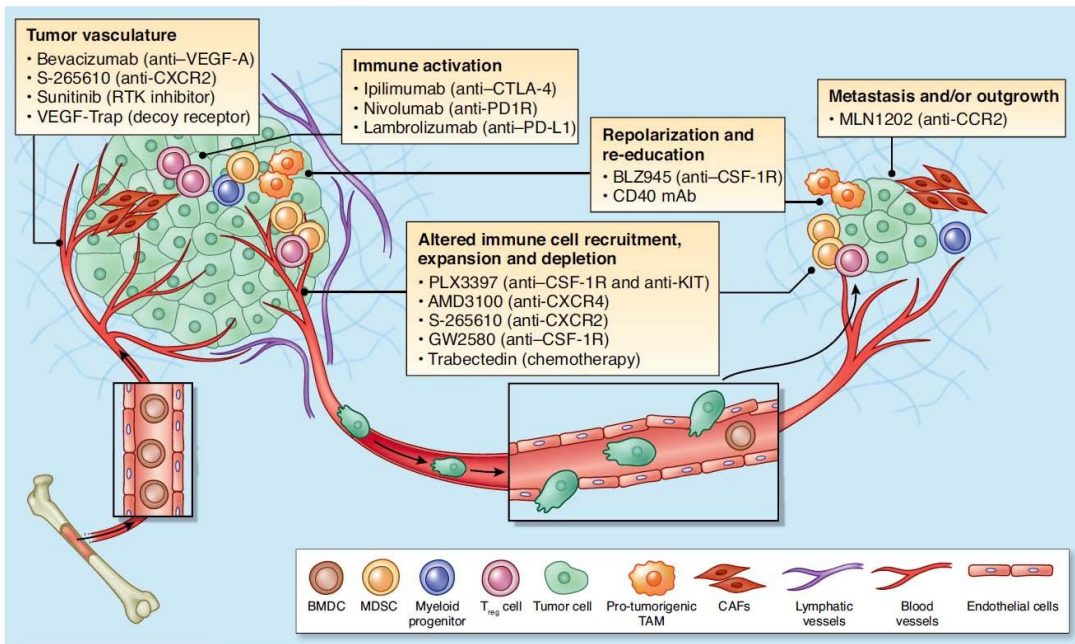


Figura 40 –Agenti terapeutici che agiscono su vari componenti del microambiente e della risposta immune contro i tumori maligni [35]

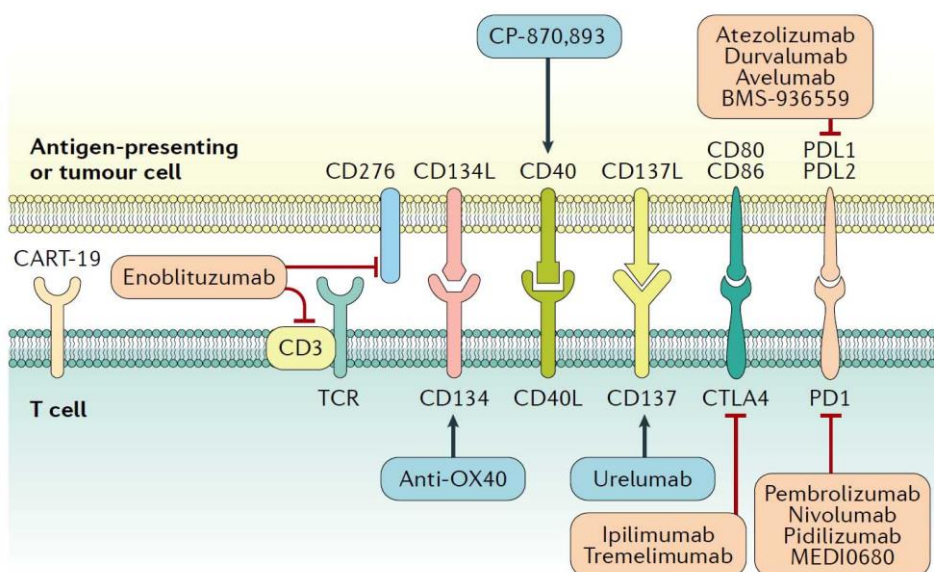


Figura 41 – Recettori e controrecettori coinvolti nella risposta immune contro i tumori [45]

## 6.- CONCLUSIONI

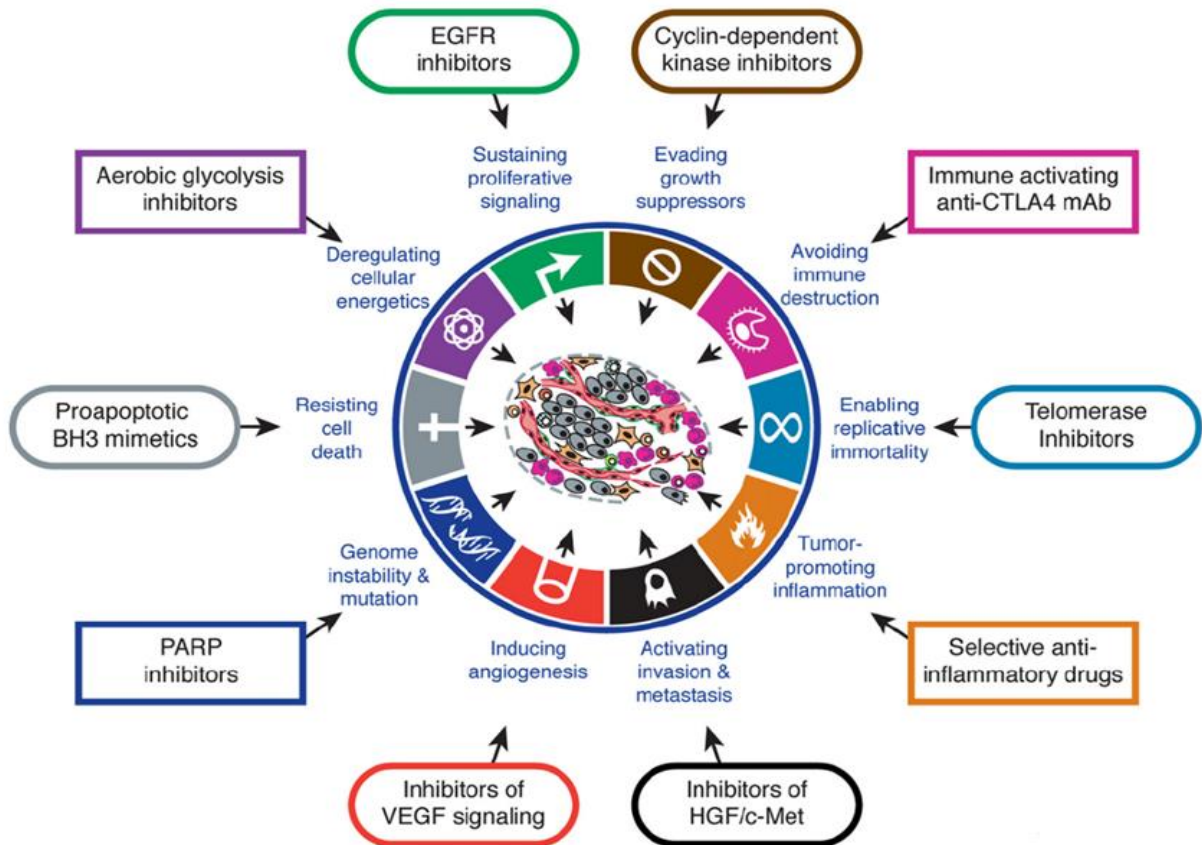
Il principale obiettivo di questa tesi era di presentare evidenze che la progressione maligna del tumore vescicale è sostenuta da una risposta integrata di pathways, attivate prima dall'ipossia (HIF1 $\alpha$ ) e poi da NFkB che permette l'acquisizione delle caratteristiche del fenotipo maligno. Le evidenze sono state ottenute sia dall'analisi molecolare di tumori di vario grado (dal carcinoma di basso grado a quello di alto grado) paragonati al tessuto ospite normale, sia da precedenti lavori del gruppo che dalla letteratura.

Di fondamentale importanza, nel nostro studio, è stato evidenziare e confermare l'espressione dei recettori per le allarmine che svolgono un ruolo principale nella successiva attivazione di NFkB; l'attivazione dei geni codificanti per MMP6-9 e CXCR4, come marcatori e predittori per l'invasione e la migrazione fino al sito di richiamo e/o di homing.

A conferma sperimentale, abbiamo visto che le cellule staminali tumorali vescicali, in condizioni ipossiche, rispondono in maniera sostanziale con l'attivazione dell'asse HIF/NFkB e l'acquisizione di proprietà della malignità. Infine, l'espressione proinfiammatoria presenta le caratteristiche di una risposta cellulo-mediata sia per le cellule attivate che per le citochine e mediatori prodotti, mettendo in evidenza un'espressione non-convenzionale dei geni proinfiammatori nelle cellule tumorali.

Il quadro presentato suggerisce che nuovi approcci diagnostici, prognostici e terapeutici sono possibili per una più precisa caratterizzazione del singolo tumore, nel singolo paziente nel corso dell'evoluzione e della progressione, approdando così alla medicina di precisione.

Oltre al controllo generale delle due vie metaboliche che si integrano nell'attività dell'asse HIF/NFkB, l'attuale attenzione della ricerca è tesa alla identificazione e validazione clinica di specifici agenti in grado di controllare in maniera specifica le singole caratteristiche biologiche del tumore maligno (Figura 42). Tuttavia, ancora molto lavoro, soprattutto di validazione clinica è ancora necessario per utilizzare appieno le nuove conoscenze accumulate sui meccanismi di progressione del carcinoma vescicale.



**Figura 42 – Riassume l'attuale situazione della ricerca di specifici agenti in grado di controllare in maniera specifica le singole caratteristiche biologiche del tumore maligno.**

## 7.- Referenze

1. AccuLift LCM Portfolio. A Renaissance in Laser Capture Microdissection. Fluidigm. December 2019.
2. Ainsworth Claire. A bag of surprises. Nature 2017 Nov 8;551(7679):S40-S41.
3. Alexander Riley E., Wang Lisha, Lopez-Beltran Antonio, Emerson Robert E., Montironi Rodolfo, Pedrosa Jose A., Kaimakliotis Hristos Z., Koch Michael O. and Cheng Liang. Human papillomavirus (HPV)-induced neoplasia in the urinary bladder: a missing link? *Histol Histopathol* 2016 Jun;31(6):595-600.
4. Berdik Chris. Unlocking Bladder Cancers. Nature 2017 Nov 8;551(7679):S34-S35.
5. Bourzac Katherine. Three known unknowns. Nature 2014 May 29;509(7502):S69-71.
6. Brody Herb, Grayson Michelle, Rusting Ricki, Hodson Richard, Batty Elizabeth, Haines Nick. Bladder Cancer. Nature 2017 Nov 9;551:S33.
7. Condeelis John and Segall Jeffrey E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*. 2003 Dec;3(12):921-30.
8. Dann Stephen G., Selvaraj Anand and Thomas George. mTOR Complex1–S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2007 Jun;13(6):252-9.
9. De Santis Elena, Di Vito Maura, Perrone Giulietta Anna, Mari Emanuela, Osti Maria, De Antoni

Enrico, Coppola Luigi, Tafani Marco, Carpi Angelo, Russo Matteo Antonio. Overexpression of pro-inflammatory genes and down-regulation of SOCS-1 in human PTC and in hypoxic BCPAP cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Elsevier Masson 2012.

10. Di Vito Maura, De Santis Elena, Perrone Giulietta Anna, Mari Emanuela, Giordano Maria Chiara, De Antoni Enrico, Coppola Luigi, Fadda Guido, Tafani Marco, Carpi Angelo and Russo Matteo Antonio. Overexpression of estrogen receptor- $\alpha$  in human papillary thyroid carcinomas studied by laser-capture microdissection and molecular biology. *Cancer Sciences*/102(10):1921-7, 2011.
11. Eisenstein Michael. Spoilt for choice. *Nature* 2017 Nov 8;551(7679):S36-S38.
12. Erdmann Jeanne. A clearer view. *Nature* 2017 Nov 8;551(7679):S44-S45.
13. Floor Sebastien L., Dumont Jacques E., Maenhaut Carine, Raspe Eric. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine*. 2012 Sep;18(9):509-15.
14. Fontana. Messa a punto un nuovo test delle urine per diagnosticare il tumore alla vescica. *Journal of Urology*, 2011.
15. Fusco Mario, Buzzoni Carlotta, Coviello Enzo, Rashid Ivan. I tumori in Italia. Rapporto 2011. La sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. *Epidemiologia e prevenzione*. Anno 35 (5-6) 2011.
16. Gatenby Robert A. and Gillies Robert J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*. 2004 Nov;4(11):891-9.

17. Grayson M. Bladder Cancer Outlook – Editorial. *Nature*, 2017 Nov 8;551(7679):S33.
18. Gu Ben J and Wiley James S. P2X7 as a scavenger receptor for innate phagocytosis in the brain. *British Journal of Pharmacology*, 2018 Nov;175(22):4195-4208.
19. Guo Wenjun and Giancotti Filippo G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular cell biology*, 2004 Oct;5(10):816-26.
20. Hanahan Douglas and Weinberg Robert A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000 Jan 7;100:57–70.
21. Hanahan Douglas and Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011 Mar 4;144(5):646-74.
22. Hornsveld Marten and Dansen Tobias B. The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxidants & redox signaling*. 2016 Aug 20;25(6):300-25.
23. Indelicato M, Pucci B, Schito L, Reali V, Aventaggiato M, Stivala F, Fini M, Russo MA and Tafani M. Role of Hypoxia and Autophagy in MDA-MB-231 Invasiveness. *J Cell Physiol*. 2010 May;223(2):359-68.
24. King MA, Ganley IG and Flemington V. Inhibition of cholesterol metabolism underlies synergy between mTOR pathway inhibition and chloroquine in bladder cancer cells. *Oncogene*, 2016 Aug 25;35(34):4518-28.
25. Kokal Miriam, Mirzakhani Kimia, Pungsrinont Thanakorn and Baniahmad Aria. Mechanisms of Androgen Receptor Agonist-and Antagonist-Mediated Cellular Senescence in Prostate Cancer.

Cancers 2020 Jul 8;12(7):1833.

26. Krochmal Magdalena, van Kessel Kim E. M, Zwarthoff Ellen C., Belczacka Iwona, Pejchinovski Martin, Vlahou Antonia, Mischak Harald, Frantzi Maria. Urinary peptide panel for prognostic assessment of bladder cancer relapse. *Scientific Reports* 2019 May 21;9(1):7635.
27. Lorenzi Teresa, Lorenzi Maria, Altobelli Emma, Marzioni Daniela, Mensà Emanuela, Quaranta Alexia, Paolinelli Francesca, Morroni Manrico, Mazzucchelli Roberta, De Luca Antonio, Procopio Antonio Domenico, Baldi Alfonso, Muzzonigro Giovanni, Montironi Rodolfo, Castellucci Mario. HtrA1 in human urothelial bladder cancer: A secreted protein and a potential novel biomarker. *Int. J. Cancer* 2013 Dec 1;133(11):2650-61.
28. McKiernan James, Asafu-Adjei Denise. Bridging the gender gap. *Nature* 2017 Nov 8;551(7679): S39.
29. Mehlen Patrick and Puisieux Alain. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*. 2006 Jun;6(6):449-58.
30. Oeyen Eline, Hoekx Lucien, De Wachter Stefan, Baldewijns Marcella, Ameye Filip, Mertens Inge. Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences* 2019 Feb 14;20(4):821.
31. Pantel Klaus and Brakenhoff Ruud H. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*. 2004 Jun;4(6):448-56.
32. Papale M, Buccarelli MC, Mollinari C, Russo MA, Pallini M, Ricci-Vitiani L, Tafani M. Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma. *Cancer Stem Cells Progression*.

International Journal of Molecular Sciences, 2020 Apr 11;21(8):2660.

33. Parlato Rosanna, Rosica Annamaria, Cuccurullo Vincenzo, Mansi Luigi, Macchia Paolo, Owens James D., Mushinski J. Frederic, De Felice Mario, Bonner Robert F. and Di Lauro Roberto. A preservation method that allows recovery of intact RNA from tissues dissected by Laser Capture Microdissection. *Analytical Biochemistry* 2002 Jan 15;300(2):139-45.
34. Pellegrini Laura, Sileno Sara, D'Agostino Marco, Foglio Eleonora, Florio Maria Cristina, Guzzanti Vincenzo, Russo Matteo Antonio, Limana Federica, Magenta Alessandra. MicroRNAs in cancer treatment-induced cardiotoxicity. *Cancers* 2020 Mar 17;12(3):704.
35. Quail Daniela F. and Joyce Johanna A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* 2013 Nov;19(11):1423-37.
36. Ravenna Linda, Salvatori Luisa and Russo Matteo Antonio. HIF3 $\alpha$ : the little we know. *The Febs Journal*, 2015 Oct 28.
37. Ravenna Linda, Sale Patrizio, Di Vito Maura, Russo Andrea, Salvatori Luisa, Tafani Marco, Mari Eleonora, Sentinelli S, Petrangeli Elisa, Gallucci Michele, Di Silverio Franco, and Russo Matteo Antonio. Up-regulation of the Inflammatory-Reparative Response in Human Prostate Carcinoma. *Prostate* 2009 Aug;69(11):1245-55.
38. Ravenna Linda, Verdina Alessandra, Principessa L, Faraglione C, Salvatori Luisa, Caporuscio Francesca, Russo Matteo Antonio, Petrangeli Elisa. Hypoxic regulation of HIF and NF-kB signaling in prostate and mesothelioma cell lines. *FEBS J*, 276 (suppl):337-338, 2009.



39. Ravenna Linda, Cardillo Irene, Curzio Gianfranca, Baldi Alfonso, Mattioni Manlio, Vincenzi Bruno, Russo Matteo Antonio, Soddu Silvia and Verdina Alessandra. Mesothelioma and Hypoxia: Modulation of the inflammation-related phenotype and identification of prognostic markers. *Journal Cancer Science Theraphy* 2014, 6(9):378-387.
40. Russo Matteo Antonio, Sansone Luigi, Carnevale Ilaria, Limana Federica, Runci Alessandra, Polletta Lucia, Perrone Giulietta A., De Santis Elena and Tafani Marco. One Special Question to Start with: Can HIF/NFkB be a Target in Inflammation? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 2015, 2015;15(3):171-85.
41. Russo Matteo Antonio, Ravenna Linda, Pellegrini Laura, Petrangeli Elisa, Salvatori Luisa, Magrone Thea, Fini Massimo and Tafani Marco. Hypoxia and Inflammation in Prostate Cancer Progression. Cross-talk with Androgen and Estrogen Receptors and Cancer Stem Cells. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 2016;16(4):235-248.
42. Salvatori Luisa, Ravenna Linda, Caporuscio Francesca, Principessa L, Coroniti G, Frati L, Russo Matteo Antonio, Petrangeli Elisa. Action of retinoic acid receptor on EGFR gene transactivation and breast cancer cell proliferation: Interplay with the estrogen receptor. *Biomed Pharmacother.* 2011 Jul 30;65(4):307-12.
43. Salvatori Luisa, Caporuscio Francesca, Verdina Alessandra, Starace Giuseppe, Crispi Stefania, Nicotra Maria Rita, Russo Andrea, Calogero Raffaele Adolfo, Morgante Emanuela, Natali Pier Giorgio, Russo Matteo Antonio, Petrangeli Elisa. Cell-to-Cell signaling influences the fate of prostate cancer stem cells and their potential to generate more aggressive tumors. *Plos One* 2012 6;7(2):e31467.

44. Sanguedolce Francesca, Cormio Luigi, Carrieri Giuseppe, Calò Beppe, Russo Davide, Menin Andrea, Pastore Antonio Luigi, Greco Francesco, Bozzini Giorgio, Galfano Antonio, Pini Giovannalberto, Porreca Angelo, Mugavero Filippo, Falsaperla Mario, Ceruti Carlo, Cindolo Luca, Antonelli Alessandro and Minervini Andrea. Role of Androgen Receptor Expression in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: a Systematic Review and Meta-analysis. 2020 May;35(5):423-432.
45. Sanli Oner, Dobruch Jakub, Knowles Margaret A., Burger Maximilian, Alemozaffar Mehrdad, Nielsen Matthew E. and Lotan Yair. Bladder cancer. Nature reviews. 2017 Apr 13;3:17022.
46. Sarant Louise. The flatworm's revenge. Nature 2017 Nov 8;551(7679):S46-S47.
47. Schito Luana, Reya Sergio, Tafani Marco, Zhanga Huafeng, Wonga Carmen Chak-Lui, Russo Andrea, Russo Matteo Antonio and Semenza Gregg L. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. Proc Natl Aca Sci, 2012 Oct 2;109(40):E2707-16.
48. Seton-Rogers Sarah. No cohesion for cohesin's role. Nature Reviews Cancer. 2013 Dec;13(12):825.
49. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. Annu Rev Immunol. 2010;28:367-88.
50. Sluyter R. The P2X7 Receptor. Adv Exp Med Biol. 2017;1051:17-53.
51. Spagnuolo Manuela, Costantini Manuela, Ferriero Mariaconsiglia, Varmi Marco, Sperduti Isabella, Regazzo Giulia, Cicchillitti Lucia, Díaz Méndez Ana Belén, Cigliana Giovanni, Pompeo Vincenzo, Russo Andrea, Laquintana Valentina, Mastroianni Riccardo, Piaggio Giulia, Anceschi Umberto,

Brassetti Aldo, Bove Alfredo, Tuderti Gabriele, Flammia Rocco Simone, Gallucci Michele, Simone Giuseppe and Maria Giulia Rizzo. Urinary expression of let-7c cluster as noninvasive tool to assess the risk of disease progression in patients with high grade non-muscle invasive bladder Cancer: a pilot study. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2020 Apr 17;39(1):68.

52. Studying hallmarks of cancer. Studying hallmarks of cancer/Abcam
53. Tafani Marco, Sansone Luigi, Limana Federica, Arcangeli Tania, De Santis Elena, Polese Milena, Fini Massimo and Russo Matteo A. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:3907147.
54. Tafani Marco, Russo Andrea, Di Vito Maura, Sale Patrizio, Pellegrini Laura, Schito Luana, Gentileschi Stefano, Bracaglia Roberto, Marandino Ferdinando, Garaci Enrico, Russo Matteo Antonio. Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. *Cancer Science*,2010 Apr;101(4):1014–1023.
55. Tafani Marco, Di Vito Maura, Frati Alessandro, Pellegrini Laura, De Santis Elena, Sette Giovanni, Eramo Adriana, Sale Patrizio, Mari Emanuela, Santoro Antonio, Raco Antonino, Salvati Maurizio, De Maria Ruggero and Russo Matteo Antonio. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *Journal of Neuroinflammation* 2011 Apr 13;8:32.
56. Tafani Marco, Pucci Bruna, Russo Andrea, Schito Luana, Pellegrini Laura, Perrone Giulietta A.,

Villanova Lidia, Salvatori Luisa, Ravenna Linda, Petrangeli Elisa and Russo Matteo Antonio. Modulators of HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B in cancer treatment: is it a rational approach for controlling malignant progression? *Frontiers in pharmacology*. 2013 Feb 12;4:13.

57. Tafani Marco, De Santis Elena, Coppola Luigi, Perrone Giulietta A., Carnevale Ilaria, Russo Andrea, Pucci Bruna, Carpi Angelo, Bizzarri Mariano, Russo Matteo Antonio. Bridging hypoxia, inflammation and estrogen receptors in thyroid cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68.2014:1–5.
58. Tafani Marco, Schito Luana, Anwar T, Indelicato M, Sale Patrizio, Di Vito Maura, Beraldi R, Makovec F, Letari O, Caselli G, Spadafora C, Pucci Bruna and Russo Matteo Antonio. The Anti-Tumoral Effect of a Novel Molecule Through Autophagic Degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Autophagy*, 2008;4:8,1-12.
59. Tafani Marco, Schito Luana, Pellegrini Laura, Indelicato M, Marfe G, Anwar T, Paradisi V, Rosa R, Pucci Bruna, and Russo Matteo Antonio. Hypoxia-Increased RAGE and P2X7R Expression Regulates Invasion of MDA-MB-231 Cells through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *Carcinogenesis*, 2011 Aug;32(8):1167-75.
60. Tafani Marco, Pucci Bruna, Russo Andrea, Schito Luana, Pellegrini Laura, Perrone Giulietta Anna, Villanova Lidia, Salvatori Luisa, Ravenna Linda, Petrangeli Elisa, Russo Matteo Antonio. Modulators of HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B in Cancer treatment: Is it a rational approach for controlling malignant progression? In "Cancer Treatment Research: Is It Time for a New Theoretical Paradigm?" (Crawford S, Ed) *Frontiers Pharmacology*, 2013;4:13.
61. Valastyan Scott and Weinberg Robert A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving

Paradigms. Cell 2011 Oct 14;147(2):275-92.

62. Wald Chelsea. A flow of information. Nature 2017 Nov 8;551(7679):S48-S50.
63. Weinberg Robert A. Coming Full Circle—From Endless Complexity to Simplicity and Back Again. Cell 2014 Mar 27;157(1):267-71.
64. Wellenstein Max D., Coffelt Seth B., Duits Danique E. M., van Miltenburg Martine H., Slagter Maarten, de Rink Iris, Henneman Linda, Kas Sjors M., Prekovic Stefan, Hau Cheei- Sing, Vrijland Kim, Drenth Anne Paulien, de Korte-Grimmerink Renske, Schut Eva, van der Heijden Ingrid, Zwart Wilbert, Wessels Lodewyk F. A., Schumacher Ton N., Jonkers Jos and de Visser Karin E. Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. Nature 2019 Aug;572(7770):538-542.
65. Willyard Cassandra. Cancer: an evolving threat. Nature 2016 Apr 14;532(7598):S166–168.
66. Witjes J.A. (Chair), Bruins H.M., Cathomas R., Compérat E., Cowan N.C., Gakis G., Hernández V., Lorch A., Ribal M.J. (Vice-chair), Thalmann G.N, van der Heijden A.G., Veskimäe E. Guidelines of Bladder Cancer. Muscle invasive and metastatic 2019
67. Worth Tammy. The bladder’s tale. Nature 2017 Nov 8;551(7679):S42-S43.
68. Zhu Fengyu, Qian Weiqing, Zhang Haojie, Liang Yu, Wu Mingqing, Zhang Yingyin, Zhang Xiuhong, Gao Qian and Li Yang. SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. Stem Cell Reports 2017 Aug 8;9(2):429-437.

TUTTI I DIRITTI RISERVATI