

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA**

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Dottorato di ricerca XXV Ciclo in**

**“Chirurgia e Biotecnologie chirurgiche”**

**Coordinatore: Prof. Lorenzo Dominioni**

**Scuola di Dottorato in**

**“Scienze Biologiche e Mediche”**



**POTENZIALE ANGIOGENICO DELLE CELLULE NATURAL  
KILLER, ISOLATE DA TESSUTI E DA SANGUE PERIFERICO  
DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA DEL POLMONE**

**RELATORE: Chiar.mo Prof. Lorenzo Dominioni**

Tesi di Dottorato di:

**Dott.ssa Elisa Nardecchia**

**Matricola: 700279**

**Anno accademico 2012-2013**

# INDICE

## **1. INTRODUZIONE**

### *1.1 IL CANCRO DEL POLMONE*

#### **1.1.1 Eziopatogenesi**

#### **1.1.2 Anatomia patologica**

#### **1.1.3 Terapia e prognosi**

### *1.2 ANGIOGENESI E ANGIOGENESI TUMORALE*

### *1.3 RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NELL'ANGIOGENESI TUMORALE*

#### **1.3.1 Cellule Natural Killer**

## **2. SCOPO DEL LAVORO**

## **3. MATERIALI E METODI**

### *3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI E PRELIEVO DEI CAMPIONI*

### *3.2 ANALISI DEI CAMPIONI*

#### **3.2.1 Digestione enzimatica dei campioni di tessuto polmonare**

#### **3.2.2 Isolamento delle cellule mononucleate da campioni di sangue periferico**

#### **3.2.3 Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule Natural Killer**

#### **3.2.4 Analisi statistica**

## **4. RISULTATI**

## **5. DISCUSSIONE**

## **6. TABELLE**

## **7. FIGURE**

## **8. BIBLIOGRAFIA**

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 IL CANCRO DEL POLMONE*

Il cancro del polmone è la più comune tra le neoplasie maligne del torace, rappresentando oltre il 90% di tutte queste; è una delle neoplasie più diffuse ed è quella a maggior incidenza in tutti i paesi occidentali. Esso costituisce a livello mondiale il 12,8% di tutti i casi di cancro ed è responsabile del 17,8% di tutte le morti per cancro.<sup>1</sup>

Ogni anno si contano nel mondo più di 1.300.000 nuovi casi di cancro del polmone, di cui circa 1.000.000 si manifestano nel sesso maschile e 300.000 nel sesso femminile.<sup>2</sup>

Se da una parte negli ultimi decenni si è verificata una lieve e progressiva diminuzione dell'incidenza di questa neoplasia nel sesso maschile, dall'altra invece vi è stato invece un netto incremento nel sesso femminile, quale conseguenza del diffondersi tra le donne dell'abitudine al fumo, con un rapporto dei casi insorti tra maschi e femmine che è ora di 2,5:1.<sup>2</sup>

Il picco di incidenza si osserva tra la 6<sup>a</sup> e la 7<sup>a</sup> decade di vita e oltre 1/3 dei casi è diagnosticato in soggetti di età maggiore di 70 anni.<sup>1</sup>

Nel 2010 in Italia si sono ammalati di tumore del polmone 23.969 uomini e 7.082 donne, per un totale di oltre 31.000 persone, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 10-15%; i decessi nel 2010 per cancro del polmone sono stati 25.076 di cui 17.417 uomini e 5.659 donne.<sup>3</sup>

### 1.1.1 Eziopatogenesi

Svariati sono i fattori, sia endogeni sia esogeni, che giocano un ruolo importante nello sviluppo del tumore del polmone. Si ritiene che essi agiscano promuovendo alterazioni a carico del DNA cellulare in grado di determinare proliferazione incontrollata della cellula mutata, con conseguente sviluppo della neoplasia.

#### Fattori endogeni

I fattori endogeni che concorrono allo sviluppo di cancro del polmone sono i fattori di carattere genetico e quelli legati a pregresse patologie polmonari.

I **fattori genetici** sono individuo-specifici, responsabili della variabilità interindividuale nella suscettibilità ai cancerogeni; infatti, a parità di esposizione a fattori esogeni, quali il fumo di tabacco e i cancerogeni professionali, solo alcuni individui sviluppano una neoplasia polmonare. Inoltre, un'anamnesi familiare positiva per cancro del polmone aumenta il rischio di sviluppo di tale malattia, soprattutto tra i non fumatori.<sup>4</sup> Ad oggi, sono stati individuati alcuni fenotipi enzimatici geneticamente determinati in grado di aumentare la sensibilità individuale ai carcinogeni ambientali. Gli enzimi interessati sono: l'arilidrossilasi e il fenotipo metabolico della debrisoquina (sistema del citocromo P450), responsabili del metabolismo degli idrocarburi aromatici policiclici, e le glutatione-S-transferasi, coinvolte nell'inattivazione di numerose tossine.<sup>4,5</sup>

La presenza di pregresse o coesistenti **patologie polmonari**, quali la fibrosi polmonare interstiziale diffusa e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), può concorrere nel determinare una maggior predisposizione allo sviluppo di un tumore polmonare. Nel caso della fibrosi polmonare interstiziale diffusa, idiopatica o secondaria, l'aumento del rischio di sviluppo di tumore del polmone è legato all'elevata attività proliferativa delle aree di metaplasia ed iperplasia focale presenti in associazione con le aree di fibrosi. Invece, nel

caso della BPCO la causa dell'incremento di tale rischio è da ricercare non tanto nel fatto che BPCO e cancro del polmone condividano lo stesso fattore eziologico, quanto nello stress ossidativo cronico subito dalle pareti delle vie aeree in corso di tale patologia.<sup>4-6</sup>

### Fattori esogeni

Tra i fattori esogeni che possono aver un ruolo nello sviluppo del cancro del polmone sono da ricordare in particolar modo il fumo di sigaretta, fattore di rischio principale, e le esposizioni ambientali ed occupazionali ad asbesto, metalli pesanti, radiazioni ionizzanti, fumi e polveri.

In particolar modo il **fumo di sigaretta** è oggi ritenuto il fattore di rischio più importante; basti pensare che l'80-90% di tutti i pazienti affetti da cancro del polmone sono fumatori o ex fumatori.<sup>1,5</sup> e che l'incidenza di cancro del polmone è andata aumentando di pari passo con il diffondersi, a partire dalla fine dell'800, del consumo di tabacco.<sup>7</sup> Secondo l'OMS, il 90-95% dei tumori polmonari è dovuto al fumo di tabacco.<sup>2</sup> Numerosi studi sperimentali e clinici inoltre sono concordi nell'affermare che esiste una stretta correlazione tra fumo di sigaretta ed insorgenza di neoplasie polmonari.<sup>8-11</sup>

Tale rischio risulta proporzionale alla durata dell'abitudine e al numero medio di sigarette fumate al giorno. Infatti, è stato calcolato che un fumatore cronico di 20 sigarette al giorno ha 1 probabilità su 8 di morire di cancro del polmone, con un rapporto di rischio tra fumatori e non fumatori di circa 25 a 1, che può aumentare sino a 60 a 1 se si consumano mediamente 40 sigarette al giorno e si inizia a fumare precocemente.<sup>1</sup> Viceversa la cessazione dell'abitudine tabagica può comportare una riduzione del rischio di cancro, che tuttavia si mantiene rilevante per 10-15 anni dopo la sospensione del fumo e permane

comunque più elevato rispetto ai non fumatori anche dopo 40 anni.<sup>5</sup> Una considerazione particolare merita il così detto fumo passivo o fumo di tabacco ambientale. Diversi studi epidemiologici hanno dimostrato la potenziale cancerogenicità del fumo passivo, da una parte evidenziando come in un ambiente domestico si abbia un aumento di rischio di tumore del polmone del 30% per i mariti non fumatori e del 20% per le mogli non fumatrici. Negli ambienti di lavoro tale rischio per i non fumatori esposti a fumo passivo è del 16-19%<sup>4,6,12</sup>. Si attribuisce circa il 25% dei tumori polmonari in soggetti non fumatori al fumo passivo.<sup>13</sup> Comunque, la correlazione tra fumo passivo ed insorgenza di cancro del polmone è meno chiara, poiché minori sono le dosi di cancerogeni inalate da soggetti non fumatori ma esposti al fumo passivo rispetto a quelle inalate dai fumatori attivi.<sup>14</sup>

In uno studio multicentrico l'associazione tra fumo di tabacco e cancro del polmone è stata dimostrata per tutti gli istotipi, ma soprattutto per il microcitoma, seguito dal carcinoma spinocellulare e dall'adenocarcinoma in minor misura.<sup>15</sup>

Per quanto riguarda l'**esposizione occupazionale** ad agenti cancerogeni, si stima mediamente che le neoplasie polmonari di origine lavorativa costituiscano il 10-15% del totale, ed i principali agenti cancerogeni responsabili di tali neoplasie sono rappresentati da: l'asbesto, alcuni metalli, gli idrocarburi aromatici policiclici (IAP) e le radiazioni ionizzanti.

L'**asbesto** è un minerale estremamente diffuso in natura, costituito da magnesio e silicato di calcio, di cui si riconoscono quattro tipi di fibre: il crisolite (o asbesto bianco, che costituisce il 90% dell'asbesto utilizzato nell'industria), la crocidolite, l'amosite e l'antofilite. Numerosi studi in letteratura hanno documentato la correlazione tra esposizione all'asbesto e neoplasia polmonare o mesotelioma pleurico, ed hanno

evidenziato come questa sia connessa alla durata dell'esposizione, al tipo di fibra a cui il soggetto è esposto (l'esposizione a crocidolite si associa ad un rischio di neoplasia polmonare in assoluto più elevato).<sup>4,6</sup>

Tra i **metalli** cancerogeni sono meritevoli di attenzione: l'arsenico nei minatori, nei fonditori e negli addetti alla produzione ed utilizzo dei pesticidi; il nichel (soprattutto se sotto forma di solfato di nichel), usato nella produzione di acciaio inossidabile e di altre leghe metalliche; e il cromo utilizzato nei processi di cromatura e di platinatura, nella concia delle pelli e nella produzioni di vernici.<sup>4-6</sup>

Gli **idrocarburi aromatici policiclici** (IAP), che si formano durante la combustione incompleta di materiale organico, aumentano il rischio di carcinoma polmonare negli esposti da 3 a 7 volte.<sup>4,6</sup>

Anche per le **radiazioni ionizzanti** assorbite dai soggetti esposti a uranio, radon e loro prodotti di decadimento si è dimostrato un ruolo eziologico nella genesi del cancro del polmone.<sup>16</sup>

L'**inquinamento atmosferico** ambientale è responsabile di circa l'1-2% delle neoplasie polmonari totali, comportando la liberazione di IAP (3,4-benzopirene) e metalli (nickel, cromo, ossido di arsenico). La difficoltà di calcolare in modo preciso l'esposizione a tali composti inficia gli studi epidemiologici atti a chiarire il rapporto tra inquinamento atmosferico e neoplasia polmonare. Tuttavia, l'incidenza e la mortalità per tumore polmonare, più elevate nelle aree urbane rispetto alle zone rurali, si correlano in modo direttamente proporzionale al tasso di urbanizzazione ed industrializzazione.<sup>5</sup>

La **dieta** svolge invece un ruolo protettivo: esiste infatti una relazione tra l'assunzione di frutta fresca e vegetali e la prevenzione del rischio di carcinoma polmonare. Ciò è dovuto alla presenza in tali alimenti di sostanze ad azione antiossidante, in particolare alcune

vitamine quali il B carotene (vitamina A), l'α-tocoferolo (vitamina E), l'acido folico, la vitamina C e il selenio.<sup>6</sup> La modalità di azione si basa sulla eliminazione dei radicali liberi presenti nell'organismo, impedendo che possano espletare un danno cellulare irreversibile.

La **patogenesi** del carcinoma polmonare è un processo complesso, che si realizza attraverso quattro differenti stadi. Il tempo di latenza tra l'esposizione ad un agente cancerogeno e lo sviluppo clinico della malattia richiede solitamente alcuni anni, durante i quali si verificano gli eventi patogeni propri del processo di cancerogenesi.<sup>6</sup> Tale processo viene schematicamente suddiviso in quattro fasi:

1. Iniziazione: il genoma cellulare va incontro a mutazioni in seguito all'esposizione ad agenti cancerogeni. Ciò comporta l'insorgenza, nella cellula interessata, di un cambiamento immediato, irreversibile e spesso non fenotipicamente evidente.
2. Promozione: le cellule trasformate nella fase precedente, pur in assenza dell'agente cancerogeno responsabile della loro trasformazione, se sottoposte a determinati stimoli (es. se indotta a proliferare), rivelano i caratteri acquisiti durante l'iniziazione.
3. Conversione: la cellula mutata acquista la capacità di migrare nel torrente circolatorio ematico e linfatico allontanandosi dal tessuto di origine.
4. Progressione: la cellula tumorale colonizza tessuti ed organi lontani da quello di partenza (metastatizzazione), proliferando al loro interno e sovvertendone la struttura in maniera irreversibile.<sup>6</sup>

I geni generalmente coinvolti, come mutati, in questo processo di cancerogenesi sono i responsabili della regolazione della crescita cellulare e sono distinti in tre grandi classi: i

proto-oncogeni, che promuovono la proliferazione cellulare; i geni onco-soppressori, che inibiscono la replicazione cellulare e i geni regolatori dell'apoptosi. Le mutazioni interessanti i proto-oncogeni sono considerate mutazioni "dominanti" poiché è sufficiente che uno solo dei due alleli di quel gene sia mutato affinché la cellula sia stimolata a crescere in maniera incontrollata. Invece, per quanto riguarda i geni oncosoppressori, si parla di mutazioni "recessive" poiché è necessario che entrambi gli alleli di quel gene siano mutati perché la cellula possa replicarsi in maniera continua. Perciò, gli individui che fin dalla nascita presentano una mutazione di uno degli alleli di un gene oncosoppressore hanno una probabilità più alta rispetto alla popolazione generale di sviluppare un tumore. I geni che regolano l'apoptosi possono comportarsi sia come i proto-oncogeni sia come gli oncosoppressori. Infine, esiste una quarta categoria di geni coinvolti nel processo di cancerogenesi, ossia i geni che regolano il processo di riparazione del DNA. Essi influenzano indirettamente la proliferazione e la morte cellulare in quanto determinano la capacità dell'organismo di riparare i danni non letali a carico di altri geni tra cui i proto-oncogeni, gli oncosoppressori e i geni che regolano l'apoptosi. I meccanismi responsabili della sintesi di prodotti genici alterati in grado di far proliferare la cellula in modo incontrollato possono essere diversi ma i più comuni sono le mutazioni geniche (quali la sostituzione, la delezione e l'inserzione) e le mutazioni di struttura dei cromosomi (quali la traslocazione, la delezione, l'inserzione e la duplicazione).

Gli oncogeni dominanti che sono spesso presi in causa nei tumori polmonari sono C-Myc (codificante per un fattore di trascrizione regolante l'espressione di diversi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare), K-RAS (codificante per una GTPasi deputata al reclutamento e all'attivazione di proteine coinvolte nella propagazione del segnale trasmesso dai recettori per i fattori di crescita e da altri recettori), EGFR e HER-2/neu

(entrambi codificanti per recettori di membrana per "EGF family", ossia la famiglia dei fattori di crescita per l'epidermide). Invece, gli oncosoppressori più comunemente deleti o inattivati sono p53 (codificante per un fattore di trascrizione regolante l'espressione di geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare e nella riparazione del genoma), RB (codificante una proteina che nel suo stato attivo inibisce la crescita cellulare), p16<sup>INK4a</sup> (codificante per una proteina inibente la replicazione cellulare quando non necessaria) e diversi geni localizzati sul cromosoma 3p (come FHIT, RASSF1A e altri ancora da identificare). Delle alterazioni genetiche sopra elencate le mutazioni di p53 sono comuni ai tumori polmonari a piccole cellule e ai tumori polmonari non a piccole cellule. Al contrario, i tumori polmonari a piccole cellule presentano più frequenti alterazioni in C-Myc e RB, mentre i tumori polmonari non a piccole cellule sono associati a mutazioni in K-RAS e p16<sup>INK4a</sup>. Sebbene sia noto che alcune modificazioni genetiche sono precoci (inattivazione di geni soppressori del cromosoma 3p) o tardive (attivazione di RAS), la sequenza temporale non è ancora ben definita. Ancora più importante è il fatto che alcune modificazioni genetiche, quali la perdita del materiale del cromosoma 3p, possono essere riscontrate nell'epitelio bronchiale normale di pazienti con cancro del polmone nonché nell'epitelio respiratorio di fumatori senza cancro del polmone, suggerendo come l'esposizione a fattori cancerogeni possa comportare la comparsa di mutazioni genetiche alle quali possono andarsene ad aggiungere altre portando, alla fine, allo sviluppo della patologia neoplastica maligna.<sup>17</sup>

Infine, raggruppamenti familiari sporadici hanno suggerito una predisposizione genetica, come il rischio variabile anche tra i forti fumatori. Tra i marcatori di suscettibilità genetica è stato identificato un ruolo del polimorfismo del gene del citocromo P-450 CPY1A1; infatti, si è visto che soggetti con alcuni alleli CPY1A1 hanno un'aumentata capacità di

metabolizzare gli agenti cancerogeni derivanti dal fumo di sigaretta e, concettualmente, hanno un rischio maggiore di sviluppare il cancro del polmone. Analogamente, i soggetti i cui linfociti nel sangue periferico vanno incontro a rotture cromosomiche in seguito ad esposizione a sostanze cancerogene correlate al fumo (genotipo sensitivo ad agenti mutageni) hanno un rischio doppio di sviluppare il tumore polmonare rispetto ai controlli.<sup>17</sup> Alle diverse fasi della cancerogenesi sopra descritta prendendo in considerazione esclusivamente le trasformazioni genomiche, corrispondono alterazioni istologiche ben precise, che nel caso del carcinoma epidermoide si è ipotizzato siano le seguenti:

1. Iperplasia: in seguito all'esposizione continua ad un agente cancerogeno l'epitelio bronchiale va incontro ad un'intensa proliferazione senza che siano presenti alterazioni genetiche tipiche del tumore.
2. Metaplasia squamosa: con il tempo ed il perdurare dello stimolo da parte dell'agente cancerogeno l'epitelio bronchiale iperplastico va incontro a trasformazione reversibile da epitelio cilindrico ad epitelio pavimentoso pluristratificato.
3. Carcinoma in situ: le cellule costituenti l'epitelio bronchiale metaplastico vanno incontro a displasia (letteralmente crescita disordinata), ossia vedono progressivamente e irreversibilmente persa la loro uniformità e il loro orientamento architettonico; però, tali modificazioni nonostante interessino l'epitelio in tutto il suo spessore non oltrepassano ancora il limite imposto dalla membrana basale.
4. Carcinoma invasivo: le modificazioni displastiche non interessano più esclusivamente le cellule dell'epitelio bronchiale ma si estendono anche alle cellule sottostanti la membrana basale.

Invece l'adenocarcinoma polmonare si è ipotizzato origini da un'alterazione pre-neoplastica denominata iperplasia adenomatosa atipica, caratterizzata da un'intensa proliferazione delle strutture ghiandolari localizzate nel contesto del tessuto polmonare.<sup>18</sup>

## 1. 1. 2 Anatomia patologica

I tumori primitivi maligni del polmone vengono classificati secondo la World Health Organization (WHO) in diversi tipi istologici (Tabella 1), tra i quali i più frequenti sono:

1. Carcinoma spinocellulare (30%-45%);
2. Adenocarcinoma (30%-45%);
3. Carcinoma indifferenziato a piccole cellule (15%-20%);
4. Carcinoma indifferenziato a grandi cellule (5 %-10%).

Il *carcinoma spinocellulare* o *epidermoide* rappresenta il 30-45% di tutte le neoplasie maligne del polmone, è più frequente nei soggetti di sesso maschile ed è l'istotipo maggiormente correlato al fumo di sigaretta. E' interessante sottolineare che nel corso degli ultimi venti anni l'incidenza del carcinoma epidermoide è diminuita dal 50% all'attuale 30%-45% circa di tutti i casi di tumore maligno del polmone. Il carcinoma spinocellulare insorge prevalentemente come neof ormazione endoluminale e stenotante nei bronchi centrali di grosso calibro dando precocemente atelettasia distale, bronchiectasie e polmoniti ostruttive, presenti nella maggior parte dei pazienti come prima manifestazione clinica; ha quindi per lo più uno sviluppo centrale, ilare o parailare e meno frequentemente origina al centro del parenchima polmonare andando spesso incontro a necrosi centrale e dando così luogo al cancro-ascenso che va posto in diagnosi differenziale con l'ascenso polmonare. Gli aspetti microscopici sono caratterizzati da forme ben differenziate, in cui si osserva produzione di cheratina, formazione di ponti intercellulari e perle cornee, e forme moderatamente e scarsamente differenziate in cui la cheratinizzazione compare solo raramente o è addirittura assente (carcinoma spinocellulare anaplastico). Ha diffusione

loco-regionale endotoracica e tende a metastatizzare tardivamente rispetto agli altri istotipi, colpendo prevalentemente i linfonodi loco-regionali; tuttavia la velocità di crescita nella sede di origine è di solito più rapida con un tempo di raddoppiamento medio di circa 115 giorni.<sup>17-21</sup> Infine, nell'epitelio bronchiale adiacente alla massa neoplastica è possibile evidenziare aree di metaplasia squamosa o di displasia epiteliale fino a focolai di carcinoma in situ.

L'*adenocarcinoma* rappresenta il 30-45% di tutte le neoplasie maligne del polmone; la sua incidenza è aumentata significativamente negli ultimi due decenni parallelamente alla diminuzione dell'incidenza del carcinoma spinocellulare ed è ora la forma più comune di cancro polmonare nelle donne e nei non fumatori. La lesione è, in genere, periferica e generalmente ha dimensioni inferiori rispetto agli altri istotipi. La diagnosi istologica di adenocarcinoma si basa sull'osservazione di strutture simil-ghiandolari e sulla presenza di cellule produttrici di mucina; in alcuni casi si osservano "cellule ad anello con castone", caratterizzate dalla presenza di abbondante muco nel citoplasma con nucleo dislocato in periferia. Si possono distinguere i seguenti sottotipi: *acinare*, *papillare*, *bronchiolo-alveolare* e *solido con produzione di muco*. Tra questi degno di nota è il *carcinoma bronchiolo-alveolare* che deriva probabilmente dai bronchioli terminali o dalle cellule di rivestimento degli alveoli. È caratterizzato dalla presenza di cellule con abbondante produzione di muco che può essere evidenziato con colorazioni specifiche per le mucine e che conferisce un aspetto translucido alla superficie macroscopica. Clinicamente riveste grande importanza il problema della diagnostica differenziale tra le alterazioni radiologiche caratteristiche del carcinoma bronchioloalveolare e quelle di talune forme di polmonite, che possono essere simili.<sup>22</sup> L'*adenocarcinoma* cresce più lentamente rispetto al carcinoma spinocellulare

(tempo di raddoppiamento medio di circa 220 giorni) ma ha una tendenza più spiccata a dare metastasi a distanza; è, a volte, associato ad aree di cicatrizzazione parenchimale.<sup>17-21</sup>

Il *carcinoma a piccole cellule* o *microcitoma* costituisce circa il 15%-20% delle neoplasie maligne del polmone. Colpisce più frequentemente il sesso maschile, la 6<sup>a</sup> e la 7<sup>a</sup> decade di vita ed è strettamente correlato al fumo di sigaretta; infatti, soltanto nell'1% dei casi si manifesta nei non fumatori. Insorge prevalentemente a livello centrale o parailare. Istologicamente è caratterizzato da cellule piccole monomorfe con scarso citoplasma e con nucleo tondeggiante o fusiforme e nucleolo piccolo e scarsamente visibile. Le cellule tumorali sono aggregate in nidi che non mostrano architettura di tipo ghiandolare o squamosa e possono produrre diversi mediatori quali l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), la serotonina, la calcitonina e l'ormone stimolante i melanociti (MSH), responsabili delle corrispettive sindromi paraneoplastiche. Dal punto di vista istologico si riconoscono tre istotipi: il *carcinoma a piccole cellule a grani d'avena* (oat-cell), il *carcinoma a piccole cellule intermedie* e il *carcinoma a piccole cellule composto*, caratterizzati tutti, com'è tipico di questa forma tumorale, da un alto grado di malignità per la precocità nel dare metastasi loco-regionali e a distanza che lo rende quasi sempre incurabile radicalmente già al momento della diagnosi.

Il *carcinoma indifferenziato a grandi cellule* rappresenta circa il 5-10% delle neoplasie polmonari. E' associato al fumo di sigaretta nel 50-55% dei casi, quindi in modo meno significativo rispetto il carcinoma a piccole cellule e al carcinoma spinocellulare. Può avere localizzazione centrale o periferica con frequenti aree di necrosi emorragica al suo interno e le cellule che lo costituiscono sono di varie dimensioni, poligonali con grande nucleo, nucleolo prominente ed abbondante citoplasma. Sono stati identificati due istotipi del

carcinoma a grandi cellule: il *carcinoma a cellule giganti* con cellule tumorali multinucleate e pleiomorfe e il *carcinoma a cellule chiare*, caratterizzato da grandi cellule con citoplasma chiaro contenente abbondante glicogeno. E' un tumore a crescita rapida con tendenza all'infiltrazione a livello ilare e alla precoce metastatizzazione a distanza.

Più semplicemente i tumori maligni primitivi del polmone possono essere istologicamente classificati in:

1. *Carcinoma a piccole cellule* (Small Cell Lung Cancer, SCLC);
2. *Carcinoma non a piccole cellule* (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC): in questo gruppo sono compresi il carcinoma spinocellulare, l'adenocarcinoma e il carcinoma a grandi cellule.

Tale classificazione semplificata ha grande importanza clinica ai fini della stadiazione, della formulazione della prognosi e della scelta della strategia terapeutica più adeguata. Per quanto riguarda la modalità di stadiazione, per il NSCLC viene utilizzato il sistema classificativo internazionale TNM (Tabella 2), dove T identifica il tumore primitivo, N l'interessamento metastatico linfonodale e M la presenza di metastasi a distanza. Le differenti categorie dei fattori T, N, M permettono la classificazione in stadi diversi che si riflette un preciso indirizzo terapeutico e prognostico (Tabella 3). Per quanto riguarda lo SCLC, ci si avvale invece della classificazione proposta dal Veterans Administration Cancer Study Group (VALCSG). Lo SCLC ha una prognosi nettamente peggiore rispetto al NSCLC, con una sopravvivenza globale a 5 anni del 3-10% rispetto al 5-80% del NSCLC.<sup>23</sup> Infine, per quanto riguarda l'atteggiamento terapeutico, lo SCLC viene trattato mediante chemioterapia e radioterapia dal momento che non è curabile chirurgicamente, ad eccezione di pochissimi casi. Il NSCLC ha come terapia d'elezione quella chirurgica (negli

stadi I-III A); radioterapia e chemioterapia talora impiegate a scopo neoadiuvante ed adiuvante della chirurgia.

Rientrano nella categoria delle lesioni di natura maligna anche i tumori a basso grado di malignità ossia il *carcinoide*, il *carcinoma adenoido-cistico (cilindroma)* e il *carcinoma mucoepidermoide*. Essi hanno un comportamento maligno con uno sviluppo infiltrativo locale e le metastasi linfoghiandolari e a distanza compaiono solo tardivamente.

### 1. 1. 3 Terapia e prognosi

Il tumore del polmone prevede una valutazione terapeutica multidisciplinare. La chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia possono essere utilizzate singolarmente o in combinazione a seconda dell'istotipo tumorale, dello stadio della malattia, dell'età e dello stato di salute generale del paziente. La resezione radicale della neoplasia è tuttora considerata, quando possibile, il trattamento d'elezione del cancro del polmone; infatti, alla resezione chirurgica radicale consegue una sopravvivenza significativamente superiore rispetto a quella dei pazienti non operati. Nel caso di soggetti con neoplasia in stadio avanzato, che non possono essere curati mediante tali metodiche, si opta per la scelta di cure palliative e di supporto, come la pleurodesi chimica per contrastare la formazione di versamento pleurico, le terapie farmacologiche sintomatiche e l'ossigenoterapia.

#### *Terapia del carcinoma non a piccole cellule*

La **resezione chirurgica** radicale della neoplasia prevede la resezione anatomica della neoplasia e della porzione di parenchima polmonare che la circonda (lobectomia, bilobectomia, pneumectomia a seconda dell'estensione della neoplasia) associata ad un'accurata linfadenectomia ilo-mediastinica. Nel caso di NSCLC questa rappresenta l'opzione terapeutica di prima scelta . In particolar modo vi è unanime accordo nell'indicare l'intervento chirurgico come trattamento d'elezione di NSCLC in stadio I e II mentre più controversa è l'indicazione al trattamento chirurgico nello stadio III.<sup>24</sup> La maggior parte degli autori, tuttavia, concorda che i pazienti in stadio IIIA e IIIB debbano essere sottoposti a cicli di chemioterapia neoadiuvante con lo scopo di ridurre le micro

metastasi, l'estensione della massa tumorale e/o l'interessamento linfonodale e di sottoporre poi tali pazienti ad intervento chirurgico radicale con l'intento di ottenere la radicalità oncologica.<sup>25</sup>

La sopravvivenza a 5 anni di pazienti in stadio I operati con intento radicale risulta variabile tra il 60% e l'80% secondo vari autori.<sup>25</sup> Per quanto riguarda gli stadi più avanzati la sopravvivenza a 5 anni nei pazienti sottoposti a trattamento varia tra il 15% e il 35% soprattutto in relazione al coinvolgimento linfonodale e alla dimensione della neoplasia stessa.<sup>26</sup>

La resezione atipica, quando sia tecnicamente eseguibile, viene eseguita nei casi in cui il paziente, nella valutazione pre-operatoria, ha scarsi volumi respiratori o importanti comorbidità (soprattutto di natura cardiologica) che possono non consentire una resezione radicale se non a discapito della qualità di vita residua.

La chirurgia resettiva polmonare maggiore può comportare una serie di complicanze più o meno gravi che devono ovviamente essere prese in considerazione quando si effettua la proposta terapeutica al paziente. Tali complicanze potrebbero essere infatti esacerbate dalle patologie coesistenti del paziente. In particolare le principali complicanze possono essere: polmonite, ARDS, atelettasia, insufficienza respiratoria, embolia polmonare, edema polmonare, infarto miocardico, aritmie, insufficienza cardiaca, gastrite emorragica, fistola parenchimale, fistola bronchiale, infezione della ferita chirurgica, emotorace, empiema. La mortalità postoperatoria è del 1-9% ed è in rapporto con l'entità della resezione, l'età del paziente, le condizioni generali preoperatorie e l'eventuale trattamento medico preoperatorio (chemioterapico e/o radioterapico).<sup>27</sup>

La **chemioterapia** riveste un ruolo importante negli stadi avanzati di NSCLC. I farmaci attivi (cisplatino, carboplatino, pemetrexed, gemcitabina, vinorelbina, taxolo, taxotere) in associazione tra loro permettono di ottenere risposte obiettive superiori al 40% ed un sensibile miglioramento della sopravvivenza. Importante è sottolineare che l'indicazione della chemioterapia prevede la documentazione cito-istologica della presenza del tumore.

Il trattamento chemioterapico trova indicazioni nei seguenti casi:

1. Carcinoma polmonare localmente avanzato dopo resezione chirurgica (stadio IIIA e IIIB), a scopo adiuvante;
2. Carcinoma polmonare localmente avanzato (stadio IIIA), a scopo di induzione preoperatoria (neoadiuvante);
3. Carcinoma polmonare localmente avanzato (stadio IIIB) e metastatico (stadio IV), con l'intento di prolungare l'aspettativa di vita del paziente.<sup>28</sup>

La **radioterapia** costituisce un valido aiuto alla chirurgia (radioterapia preoperatoria e postoperatoria) e rappresenta il trattamento d'elezione per quella categoria di pazienti che per età, condizioni generali, ridotta funzionalità respiratoria e cardiaca non può essere candidabile a un intervento chirurgico radicale. Anche l'indicazione della radioterapia prevede la documentazione cito-istologica della presenza del tumore.

Per quanto riguarda la radioterapia radicale, anche se mancano confronti diretti tra chirurgia e radioterapia nel trattamento degli stadi I e II, la sopravvivenza a lungo termine ottenuta con la radioterapia è apparentemente inferiore a quella ottenuta con la chirurgia, tuttavia nel caso degli stadi IIIA e IIIB non operabili l'esclusivo trattamento radioterapico consente una sopravvivenza a 5 anni del 20%.<sup>29</sup>

Infine, la radioterapia riveste spesso un ruolo di palliazione e di supporto come controllo della sintomatologia conseguente alla diffusione loco-regionale o metastatica della malattia.

## **1.2 ANGIOGENESI E ANGIOGENESI TUMORALE**

L'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da una vascolatura pre-esistente, è una fase essenziale nella crescita e nello sviluppo di una massa tumorale poiché i tumori crescono ed assumono capacità invasive solo quando sono in grado di formare una rete capillare connessa a quella dell'ospite.

La neoangiogenesi normalmente rappresenta un processo fisiologico che prevede la stimolazione proliferativa e la migrazione delle cellule endoteliali, dando origine alla formazione di nuovi capillari. Le cellule endoteliali sono particolarmente attive durante lo sviluppo embrionale, mentre, nell'adulto il loro turnover è molto lento e limitato a particolari fenomeni fisiologici, quali l'ovulazione, la riparazione tissutale e la cicatrizzazione.<sup>30,31</sup>

Il meccanismo angiogenico è molto complesso poiché la formazione della nuova rete di vasi prevede un passaggio multi-step ben definito, che porta a modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare.

Il primo "step" di tale processo prevede la destabilizzazione dei vasi pre-esistenti con aumento della permeabilità vasale e perdita delle connessioni tra cellule endoteliali. Nel secondo "step" le cellule endoteliali vengono attivate, proliferano e migrano nel punto del tessuto dove è necessaria la formazione di un neo-vaso. Il terzo "step" corrisponde alla differenziazione delle cellule endoteliali, con arresto della proliferazione cellulare e la formazione di capillari primitivi. Infine, nel corso del quarto "step" si verifica il richiamo di cellule subendoteliali di supporto (periciti, cellule della muscolatura liscia) con conseguente riorganizzazione delle interazioni cellulari e stabilizzazione del vaso neoformato.<sup>32,33</sup>

Il primo a suggerire che la crescita tumorale potesse essere dipendente dalla formazione di una nuova rete di capillari fu Judah Folkman nel 1971.<sup>34</sup> Successivamente diversi studi hanno confermato tale ipotesi e ad oggi è largamente riconosciuto che il processo angiogenetico rappresenta una tappa obbligata nello sviluppo dei tumori solidi, poiché la crescita progressiva di una neoplasia e la sua eventuale metastatizzazione, dipendono dallo stabilirsi di un adeguato apporto ematico, e cioè dall'angiogenesi.<sup>35-37</sup>

Infatti più del 95% delle neoplasie hanno origine come micro-tumori in situ che si formano in strati epiteliali distinti dalla vascolatura pre-esistente: questi noduli microscopici sono in grado di crescere e formare dei tumori macroscopici solo dopo l'attivazione del processo di angiogenesi nei tessuti adiacenti al nodulo.

L'angiogenesi fisiologica e patologica sono finemente regolate da un equilibrio tra fattori stimolatori ed inibitori rilasciati dal parenchima cellulare e dalle cellule linfoidi circolanti come linfociti T, mastociti e macrofagi (Tabella 4). Quando questo equilibrio viene a mancare a causa di specifici stimoli (switch angiogenico), si determina uno sbilanciamento della produzione dei fattori pro-angiogenici e di conseguenza un processo patologico di crescita neoplastica.<sup>38,39</sup> In tale contesto infatti la netta prevalenza di fattori pro-angiogenesi porta alla formazione di un'estesa rete di vasi sanguigni che assicurano un costante apporto di nutrienti e di ossigeno, prerequisito importante per la crescita tumorale, l'invasione tissutale e la disseminazione metastatica.

In letteratura sono stati descritti diversi meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali sono in grado di attivare lo switch angiogenico:

- **Aggregazione con la vascolatura esistente:** le cellule neoplastiche si sviluppano attorno ai vasi pre esistenti, ne inducono l'apoptosi delle cellule endoteliali, distruggono

l'architettura tridimensionale vascolare e successivamente inducono formazione di nuovi vasi.<sup>40</sup>

- **Reclutamento di precursori emopoietici:** il tumore, mediante la secrezione di fattori chemotattici e VEGF, può richiamare precursori emopoietici ed endoteliali affinché questi vadano ad integrarsi nel nuovo letto vascolare.<sup>41,42</sup>

- **Reclutamento leucocitario:** alcuni tipi di neoplasie sono in grado di mobilitare cellule ematopoietiche differenziate come mast-cellule, monociti, macrofagi e altre cellule del sistema immunitario che possono sostenere l'angiogenesi tumorale mediante il rilascio di molecole pro-angiogeniche.<sup>43</sup>

### ***1.3 RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NELL'ANGIOGENESI TUMORALE***

Negli ultimi anni è emerso che il processo di crescita e progressione tumorale non è dovuto esclusivamente alla massa cellulare neoplastica, ma che a svolgere un ruolo importante contribuisce anche la componente del microambiente tumorale, venendosi così a costituire un network altamente associato dove infiammazione, neoplasia ed angiogenesi interagiscono in maniera sinergica.<sup>44-46</sup>

Il microambiente tumorale è un tessuto molto dinamico ed eterogeneo, dove le cellule neoplastiche sono in continua interazione con lo stroma e le molteplici componenti cellulari quali: cellule endoteliali e loro precursori, periciti, cellule muscolari lisce, fibroblasti, miofibroblasti, neutrofili, eosinofili, basofili, mastociti, linfociti (T, B, cellule natural killer) e cellule presentanti l'antigene come macrofagi e cellule dendritiche. Tutte queste cellule posseggono un ruolo cruciale nella crescita e nella progressione neoplastica, stimolando la formazione di vasi sanguigni e potendo quindi rappresentare dei potenziali bersagli terapeutici.<sup>47</sup>

L'infiltrato infiammatorio tumorale, normalmente reclutato in sede neoplastica per l'eradicazione della patologia, costituisce un' arma vera e propria per il tumore grazie all'abilità di riprogrammare o meglio polarizzare le cellule del sistema immunitario rendendole in grado di favorire la progressione tumorale, i fenomeni di angiogenesi e di metastatizzazione. Il tumore agisce sull'infiltrato infiammatorio non in funzione di una componente singola, ma come complesso eterogeneo in quel sistema che viene definito microambiente tumorale.<sup>44,46,48-50</sup>

Ad esempio, è ormai noto che i macrofagi possono presentare due principali fenotipi: 1) i cosiddetti "M1", fortemente anti-batterici, che hanno una capacità di distruzione tessutale che potrebbe essere anche anti-tumorale, e 2) i macrofagi "M2", caratterizzati da un fenotipo che favorisce la ricostruzione tessutale con attività pro-angiogenica e pro-tumorale. Nei tumori il fenotipo "M2" predomina e ciò costituisce un chiaro esempio di come i tumori siano in grado di sovvertire il sistema immunitario al loro vantaggio.<sup>48</sup> Ma anche altre cellule dell'immunità possono presentare questa caratteristica: ad esempio esistono vari fenotipi caratterizzanti neutrofili, tuttavia si sa poco del fenotipo predominante nei tumori di queste cellule e dell'eventuale correlazione con l'aspetto funzionale.

### 1.3.1 Cellule Natural Killer (NK)

Le cellule Natural Killer (NK) costituiscono il 10-15% dei linfociti circolanti e hanno un ruolo cruciale nell'immunità innata. Esse sono in grado di eliminare le cellule target dell'ospite senza che ci sia il riconoscimento di un antigene specifico o una pregressa sensibilizzazione.<sup>51</sup>

Morfologicamente si presentano come "Large granular lymphocytes" con biologia cellulare molto complessa, per la presenza di diversi sottogruppi.

Tali cellule fenotipicamente sono caratterizzate dall'espressione degli antigeni di superficie CD56 e CD16.<sup>52</sup>

L'antigene CD56 è responsabile dell'interazione tra le cellule NK e le cellule bersaglio, mentre il CD16 è coinvolto nella citotossicità cellulare anticorpo mediata. In base alla densità di superficie degli antigeni CD56 e CD16 si sono individuate due sottopopolazioni: le cellule che esprimono CD56 a bassa intensità (CD56dim) e CD16 ad alta intensità (circa 90%) e le cellule che esprimono CD56 ad alta intensità (CD56bright) e sono negative per CD16 o lo esprimono a bassa intensità. Le cellule CD56dim svolgono prevalentemente un'azione citotossica, mentre le cellule CD56bright sono principalmente cellule secernenti citochine, quali TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ .<sup>53</sup>

Le cellule NK pertanto intervengono nelle prime fasi della risposta immunitaria attraverso:

- la secrezione di citochine, come il "tumor necrosis factor  $\beta$ " (TNF- $\beta$ ), l'interferone (INF), la IL-10, la IL-13 e il fattore di crescita dei granulociti-macrofagi (GM-CSF). Mediante la produzione di queste citochine, le cellule NK agiscono sulla risposta infiammatoria, modulano l'immunità adattiva ed inducono la maturazione delle cellule dendritiche;

- l'attività citotossica mediata da recettori di membrana denominati Recettori Natural Killer (NKR) e anticorpo mediata (ADCC), per l'eliminazione di cellule infettate da virus e cellule tumorali.<sup>53</sup>

E' inoltre risaputo che le cellule NK costituiscono anche uno dei tipi cellulari predominanti nello sviluppo delle decidue durante l'impianto dove controllano la formazione delle arterie spirali.<sup>51</sup>

Queste cellule NK deciduali, o cellule dNK, sono in grado di produrre citochine e presentano un fenotipo altamente angiogenico, in grado di produrre un aumento significativo della crescita dei tumori xeno trapiantati in modelli animali.<sup>54</sup>

Come molte altre cellule immunitarie, le cellule NK infiltranti i tumori potrebbero esprimere quindi un pattern funzionale variabile e per tale motivo abbiamo ipotizzato che queste cellule possano essere rappresentative di un meccanismo chiave in grado di favorire l'angiogenesi tumorale. Uno studio recente inoltre ha dimostrato che i tumori umani del polmone non a piccole cellule (NSCLC) sono infiltrati da cellule NK CD56bright CD16, competenti per la produzione di citochine anti tumorali ma non in grado di lisare le cellule tumorali.<sup>55</sup>

La verosimiglianza di tali NKs CD56bright CD16-, predominanti nei pazienti con NSCLC come le NK deciduali, ci ha indotto a ipotizzare un ruolo importante di questo subset nei fenomeni di pro-angiogenesi tumorale.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare il ruolo delle cellule NK nella crescita e nella proliferazione neoplastica dei pazienti affetti da NSCLC. In particolar modo, si è voluto valutare se queste cellule possano mostrare un'attività pro-angiogenica e pro-tumorale, potendo così rappresentare dei potenziali bersagli terapeutici nei pazienti affetti da tumore del polmone.

Gli obiettivi dello studio sono stati i seguenti:

- Valutare il ruolo delle cellule NK nell'angiogenesi tumorale, analizzando le cellule infiltranti i tumori in pazienti affetti da NSCLC;
- Confermare la presenza di un fenotipo predominante nelle cellule NK infiltranti i tumori, comparandole con le cellule NK non tumorali;
- Analizzare il profilo di citochine pro-angiogeniche (VEGF, PlGF, IL-8) prodotte dalle cellule NK infiltranti i tumori e verificare il loro ruolo nell'indurre angiogenesi tumorale;
- Identificare una possibile correlazione tra le cellule NK infiltranti i tumori con specifico fenotipo ed il tipo istologico di neoplasia polmonare;
- Identificare i possibili meccanismi di polarizzazione delle cellule NK infiltranti NSCLC mediati dal tumore e dal microambiente tumorale;
- Identificare dei possibili bersagli per terapie anti-angiogenetiche.

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

#### **3.1 SELEZIONE DEI PAZIENTI E PRELIEVO DEI CAMPIONI**

Lo studio ha previsto il prelievo di campioni di tessuto polmonare di pazienti affetti da NSCLC e di pazienti affetti da patologia non tumorale (pneumotorace spontaneo e/o malattia bollosa), costituenti il gruppo controllo. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti affetti da: DM, HBV, HIV, HCV positivi, patologia infiammatoria cronica, precedentemente sottoposti a CHR e/o RT, in trattamento immunosoppressivo.

Per ciascun paziente arruolato è stata prevista :

1. la compilazione di una scheda di raccolta dati comprendente dati epidemiologici, abitudine al fumo, istotipo tumorale, stadio di malattia, presenza di comorbilità associate;
2. il prelievo di duplice campione di parenchima polmonare (frammento di tessuto neoplastico, frammento di tessuto polmonare sano adiacente al tumore) in corso di intervento chirurgico resettivo polmonare nei pazienti affetti da NSCLC;
3. il prelievo di campione di parenchima polmonare da pazienti affetti da pneumotorace spontaneo e/o malattia bollosa (gruppo controllo);
3. il prelievo di campioni di sangue periferico in tutti i pazienti prima dell'esecuzione dell'intervento chirurgico resettivo polmonare.

## **3. 2 ANALISI DEI CAMPIONI**

### **3. 2. 1 Digestione enzimatica dei campioni di tessuto polmonare**

I campioni di tessuto polmonare (tumore, tessuto peri-tumorale sano, tessuto polmonare dei pazienti del gruppo controllo), dopo il prelievo, sono stati raccolti in un contenitore sterile contenente una quantità di soluzione tampone salina sterile a 4°C sufficiente a coprirli. I frammenti tissutali successivamente sono stati trasferiti in laboratorio (entro e non oltre le 24 ore dalla raccolta) e sottoposti ad un processo di disaggregazione meccanica/enzimatica al fine di ottenere una sospensione di singole cellule per ogni campione. I campioni polmonari sono stati sezionati in minuti frammenti, i quali sono stati poi sottoposti ad un processo di digestione enzimatica mediante immersione in una soluzione contenente DNAsi (100 µg/ml, Roche), Collagenasi (1 mg/mL, Sigma Aldrich), RPMI 1640 con l'1% di soluzione Penstrep, per 1 ora alla temperatura di 37°C. La sospensione così ottenuta è stata poi filtrata, al fine di ottenere una sospensione di singole cellule e centrifugata in una soluzione tampone fosfato salina per rimuovere i residui enzimatici.

### **3. 2. 2 Isolamento delle cellule mononucleate da campioni di sangue periferico**

Campioni di sangue periferico sono stati raccolti in provette Vacutainer prima dell'esecuzione dell'intervento chirurgico resettivo polmonare.

Al fine di isolare la componente cellulare mononucleata ematica, comprendente quindi le cellule natural killer, i campioni di sangue periferico sono stati diluiti 1:1 in una soluzione

contenente RPMI 1640 (LONZA). La sospensione così ottenuta è stata poi stratificata su Ficoll (LONZA) e centrifugata 500 x g per 30 min. a temperatura ambiente. I linfociti così ottenuti sono stati quindi collocati in una nuova provetta e centrifugati in soluzione tampone fosfato salina.

### **3. 2. 3 Caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule Natural killer**

Una parte delle sospensioni cellulari così ottenute, contenenti le sottopopolazioni di cellule NK ( $3 \times 10^5$  cellule per campione di sangue, tessuto neoplastico e tessuto adiacente al tumore), sono state quindi sottoposte ad immuno-fenotipizzazione mediante staining con anticorpi anti CD3, CD56, CD16 al fine di valutare, mediante analisi a citofluorimetria a flusso (FACS), la distribuzione dei subset di cellule NK all' interno dei campioni raccolti.

Inizialmente sono stati identificati i linfociti in base all'espressione di CD45, successivamente le cellule NK sono state distinte mediante l'espressione di CD56 e la negatività per CD3. Le sottopopolazioni cellulari così ottenute sono state poi valutate per l'espressione CD16<sup>+/-</sup>, al fine di caratterizzare la distribuzione di tali cellule nei campioni in esame.

Le cellule NK isolate dai campioni tissutali ed ematici sono state poi poste in coltura per una notte in RPMI 1640, addizionata con 1% di Penstrep, IL-2 100 U/ml a 37°, 5% CO<sub>2</sub> e successivamente sottoposte per 6 ore a stimolazione con calcio ionoforo (ionomicina, 500 ng/ml) e esteri del forbolo (PMA, 10 ng/ml). Le cellule sono state quindi trattate mediante fissaggio con Cytotfix/Cytoperm e soluzione permeabilizzante.

Una parte dei surnatanti così ottenuti sono stati sottoposti a valutazione relativa alla produzione di citochine pro-angiogeniche (VEGF, PlGF, IL-8) e anti-angiogeniche (IFN $\gamma$ ) mediante intra-cellular staining e successiva analisi citofluorimetrica.

Un'altra parte di surnatanti ottenuti come sopra descritto sono stati utilizzati invece per la determinazione del loro potenziale pro-angiogenico mediante la valutazione della loro abilità nel reclutare cellule endoteliali e a formare strutture tubulari in vitro. A tal scopo abbiamo quindi valutato la capacità delle cellule NK di indurre chemiotassi delle cellule endoteliali di vene ombelicali umane (HUVEC) attraverso saggio di migrazione su camera di Boyden e la loro abilità a formare strutture tubulari mediante saggio di morfogenesi.

Nel primo caso HUVEC ( $5 \times 10^4$  cellule/cella) sono state seminate nella parte superiore della camera mentre il compartimento inferiore è stato riempito con surnatanti di cellule NK; dopo incubazione di 6 ore le cellule migrate sono state sottoposte a conta. Nel secondo caso è stata utilizzata una piastra di 24 celle debitamente riempite con Matrigel, precedentemente refrigerata a  $-20^\circ$ . HUVEC ( $5 \times 10^4$  cellule/cella) sono state poi poste in sospensione di surnatante di cellule NK sottoposte o meno a stimolazione come descritto in precedenza. Gli effetti sulla crescita e sulla morfogenesi delle cellule endoteliali sono stati successivamente valutati mediante osservazione al microscopio, a distanza di 6 e 24 ore.

### **3. 2. 4 Analisi statistica**

Il numero e le frequenze dei differenti subset delle cellule NK, esprimenti o meno fattori pro-angiogenici sono stati valutati mediante FACS.

T-test ed ANOVA sono stati utilizzati per confrontare la differente espressione delle cellule NK nei tumori e nei tessuti sani, considerando statisticamente significativi valori di  $p < 0.05$ .

## 4. RISULTATI

Nel periodo compreso tra Gennaio 2009 e Dicembre 2011, presso il Centro di Ricerca in Chirurgia Toracica - Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, in collaborazione con il Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita dell'Università degli Studi dell'Insubria, sono state isolate cellule Natural Killer in un totale di 41 pazienti. Di questi: 31 pazienti erano affetti da NSCLC e sono stati sottoposti per tale motivo ad intervento chirurgico resettivo polmonare maggiore (pneumonectomia 1, lobectomia 27, resezione atipica 3) (età media: 69 anni; range 52-79); 10 pazienti, rappresentanti il gruppo controllo, erano invece affetti da distrofia bollosa polmonare e per tale motivo sono stati sottoposti a resezione polmonare atipica (età media: 27 anni; range 16-69).

Il 90% (28/31) dei pazienti affetti da neoplasia polmonare erano di sesso maschile, per la maggior parte fumatori (38%) o ex-fumatori (52%). Il tipo istologico maggiormente rappresentato in questo gruppo di pazienti è risultato l'adenocarcinoma (55%; 17/31 pazienti), seguito dal carcinoma spinocellulare (29%; 9/31 pazienti). Nel 58% dei casi, tali pazienti erano in uno stadio precoce di malattia neoplastica polmonare (29% IA e 29% IB).

I 10 pazienti affetti da distrofia bollosa polmonare, rappresentanti il gruppo controllo, erano prevalentemente giovani adulti maschi (90%), fumatori (60%) o ex fumatori (10%) (tabella 5).

Dall'analisi dei pazienti è stato possibile ottenere i seguenti risultati:

- Le cellule NK infiltranti i tessuti neoplastici polmonari sono caratterizzate dalla presenza di un subset di cellule CD56+CD16- significativamente predominante ( $p < 0,001$ ), rispetto a quanto accade nel sangue periferico e nel tessuto peri-

tumorale dei pazienti affetti da NSCLC analizzati, dove il subset di cellule NK maggiormente rappresentato risulta avere fenotipo CD56+CD16+ (Fig 1A).

- Analogο comportamento si riscontra nelle cellule NK isolate dal sangue e dal tessuto polmonare di donatori sani, dove anche in questo caso prevale il fenotipo CD56+CD16+ (Fig 1B).
- Non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra predominanza del subset CD56+CD16- in correlazione con i parametri quali tipo istologico della neoplasia (adenocarcinoma vs carcinoma squamoso) (Fig 1C) e status di fumatore dei pazienti analizzati (Fig 1 D).
- Le cellule NK CD56+CD16-isolate dai pazienti affetti da NSCLC, sono risultate essere in grado di produrre diverse citochine pro-angiogeniche, quali VEGF, PlGF e IL-8 (Fig 2), abilità che è stata evidenziata anche a livello sistemico nel sangue periferico dei pazienti valutati. Si è osservato inoltre che le cellule NK derivate da pazienti con carcinoma squamoso sono in grado di produrre un maggior quantitativo di citochine pro-angiogeniche, rispetto a quelle isolate da pazienti con adenocarcinoma polmonare (Fig 2).
- Le cellule NK isolate da pazienti affetti da NSCLC, opportunamente stimulate, sono in grado inoltre di indurre ex vivo il reclutamento di cellule endoteliali di vene ombelicali umane mediante chemiotassi e di promuovere l'attivazione dell'endotelio di tali vene in modo da formare delle strutture simil-capillariformi. In particolar modo ciò è stato riscontrato nel caso di NK derivate da pazienti affetti da carcinoma squamoso (Fig 3).

## 5. DISCUSSIONE

La crescita e la proliferazione neoplastica rappresentano un processo altamente complesso che comporta una forte interazione fra il tumore e il microambiente che lo circonda. La stretta correlazione tra fenomeno flogistico e quello neoplastico ha portato a considerare l'infiammazione come uno dei segni caratteristici del cancro<sup>56</sup>. I mediatori e gli effettori cellulari dell'infiammazione sono infatti costituenti importanti del microambiente tumorale.

E' noto che le cellule dell'immunità sono in grado di esercitare un controllo su differenti tipi di neoplasie, limitandone la crescita e la disseminazione.<sup>57,58</sup> Studi recenti hanno messo in evidenza come queste stesse cellule possano avere un ruolo pro-tumorale, favorendo quindi lo sviluppo e la crescita neoplastica<sup>44,46</sup>. Queste funzioni opposte sono dovute alla capacità del tumore di polarizzare le cellule dell'immunità a proprio vantaggio, stimolando la crescita tumorale e l'angiogenesi, così come già dimostrato per i macrofagi.<sup>59,60</sup> In tal senso poco è conosciuto in letteratura sulla capacità pro-tumorale delle cellule NK. Le cellule NK infiltranti i tumori possono presentare diversi fenotipi, ognuno dei quali si correla ad una attività produttiva di citochine, citotossica, promotiva o inibitoria dell'angiogenesi tumorale. Precedenti studi hanno dimostrato che i tessuti neoplastici derivanti da pazienti affetti da NSCLC esprimono alti livelli di cellule NK con subset CD56+CD16- che possiede una capacità limitata di eliminare le cellule neoplastiche

55.

I nostri risultati hanno confermato che le cellule NK infiltranti le neoplasie polmonari presentano un subset di cellule significativamente predominante ( $p < 0,001$ ) con fenotipo CD56+CD16- e che questo è in grado di produrre citochine pro-angiogeniche, quali VEGF,

PlGF e IL-8. I nostri risultati suggeriscono quindi che anche le cellule NK possano subire un processo di polarizzazione in modo tale da esprimere un particolare subset che sia a favore della crescita neoplastica.

Analizzando poi la correlazione tra produzione di citochine pro-angiogeniche e tipo istologico di tumore polmonare, dall'analisi dei nostri dati è risultato che tale produzione era particolarmente elevata nei pazienti affetti da carcinoma squamoso, sia nei tessuti neoplastici che nel sangue periferico. Tale osservazione sta ad indicare che l'istotipo squamoso possiede una rilevante influenza sulle cellule NK, determinando delle modificazioni in termini di espressione fenotipica sia localmente che a livello sistemico. Infatti, nei pazienti affetti da carcinoma squamoso polmonare sono stati riscontrati livelli di produzione di VEGF da parte delle cellule NK CD56+CD16- significativamente più elevati rispetto ai pazienti affetti da adenocarcinoma, sia a livello del tessuto neoplastico, sia nel tessuto polmonare adiacente, sia nel sangue periferico. In tali pazienti, abbiamo riscontrato inoltre un'elevata produzione di PlGF, nel tessuto peritumorale e nel sangue periferico.

Infine, dalla nostra analisi è emerso che le cellule NK isolate da pazienti affetti da NSCLC sono in grado di indurre ex vivo il reclutamento di cellule endoteliali mediante chemiotassi ed attivazione dell' endotelio in modo da formare delle strutture simil-capillariformi e in particolar modo ciò è stato riscontrato nei pazienti affetti da carcinoma squamoso.

In conclusione, i nostri risultati evidenziano che le cellule NK con fenotipo CD56+CD16-, infiltranti NSCLC rivestono un ruolo importante nel processo di sviluppo neoplastico, possedendo la capacità di produrre alti livelli di citochine pro-angiogeniche e di

determinare così la formazione di una fitta rete capillare in grado di apportare gli elementi necessari al tumore per poter crescere e diffondere.

Tutte queste capacità inoltre sembrano essere maggiormente rappresentate nei pazienti affetti da carcinoma squamoso e da ciò deriva la possibilità di poter considerare le cellule NK un ulteriore possibile bersaglio terapeutico nel trattamento del carcinoma squamoso del polmone.

## 6. TABELLE

**Tabella 1.** Classificazione istologica dei tumori maligni del polmone (WHO/IASLC, 2004).

- 
- Carcinoma a cellule squamose (epidermoide)
  - Carcinoma a piccole cellule (microcitoma, oat cell)
  - Adenocarcinoma (acinoso, papillare, solido, bronchiolo-alveolare)
  - Carcinoma indifferenziato a grandi cellule
  - Carcinoide
  - Carcinoma sarcomatoide
  - Carcinoma adenosquamoso
  - Carcinoma del tipo ghiandole salivari (adenoido-cistico, mucoepidermoide)
  - Mesotelioma
  - Sarcoma
  - Linfoma
  - Melanoma
  - Tumore a cellule germinali
-

**Tabella 2.** Parametri TNM per la stadiazione di NSCLC,(VII ed, 2010).

---

Tumore primitivo (T)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Tx</li><li>▪ T0 Non evidenza di tumore primitivo</li><li>▪ T1s Carcinoma in situ</li><li>▪ T1 Tumore con dimensione massima di 3 cm, circondato da polmone o pleura viscerale, senza, segni di invasione prossimalmente ad un bronco lobare alla broncoscopia (*) T1a Tumore con dimensione <math>\leq 2</math> cm T1b Tumore <math>&gt; 2</math> cm ma <math>\leq 3</math> cm</li><li>▪ T2 Tumore con dimensione superiore a 3 cm ma <math>\leq 7</math> cm o tumore con una delle seguenti caratteristiche: coinvolge il bronco principale a più di 2 cm dalla carena; invade la pleura viscerale; è associato ad atelettasia o a polmonite ostruttiva che si estende fino alla regione ilare ma non coinvolge l'intero polmone T2a Tumore <math>&gt; 3</math> cm ma <math>\leq 5</math> cm T2b Tumore <math>&gt; 5</math> cm ma <math>\leq 7</math> cm</li><li>▪ T3 Tumore <math>&gt; 7</math> cm o che abbia estensione diretta ad una delle seguenti strutture: parete toracica (incluso il tumore del solco superiore), diaframma, nervi frenici, pleura mediastinica, pericardio parietale; oppure tumore del bronco principale a meno di 2 cm dalla carena ma senza il suo coinvolgimento; oppure atelettasia o polmonite ostruttiva dell'intero polmone; oppure presenza di noduli nello stesso lobo</li><li>▪ T4 Tumore di qualsiasi dimensione con invasione di: mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, esofago, corpi vertebrali, nervi ricorrenti o la carena o con presenza di noduli satelliti in altro lobo omolaterale</li></ul>
Linfonodi (N)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Nx</li><li>▪ N0 Non metastasi dimostrabili nei linfonodi regionali.</li><li>▪ N1 Metastasi nei linfonodi delle regioni peribronchiale e/o ilare omolaterale e intrapolmonari compresa l'invasione diretta</li><li>▪ N2 Metastasi nei linfonodi mediastinici omolaterali oppure sottocarenali</li><li>▪ N3 Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari controlaterali, omolaterali o controlaterali scalenici o sovraclaveari</li></ul>
Metastasi a distanza (M)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Mx</li><li>▪ M0 Assenza di metastasi a distanza.</li><li>▪ M1 Metastasi a distanza M1a Presenza di noduli tumorali nei lobi controlaterali; tumori con noduli pleurici o presenza di versamento pleurico o pericardico maligno (**) M1b Metastasi a distanza</li></ul>

---

**Tabella 3.** Stadiazione TNM del tumore del polmone non a piccole cellule (VII edizione, 2010).

Stadio	0	Tis	N0	M0
Stadio	IA	T1a, b	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Stadio	IIA	T1a, b	N1	M0
		T2a	N1	M0
		T2b	N0	M0
	IIB	T2b	N1	M0
		T3	N0	M0
Stadio	IIIA	T1, T2	N2	M0
		T3	N1, N2	M0
		T4	N0, N1	M0
	IIIB	T4	N2	M0
		Ogni T	N3	M0
Stadio	IV	Ogni T	Ogni N	M1a, b

**Tabella 4.** Fattori endogeni regolatori dell'angiogenesi

---

<b>PRO-ANGIOGENICI</b>	<b>ANTI-ANGIOGENICI</b>
Angiogenina	Angioarrestina
Angiopoiatina- 1	Angiotensina
a-FGF	Tumstatina
b-FGF	Interferoni
Eritropoietina	Angiostatina
TNF- $\alpha$ (bassi livelli)	TNF- $\alpha$ (alti livelli)
Interleuchina-8	Interleuchina-12
VEGF	Inibitori tissutali delle metalloproteasi
PlGF	Vasculostatina
PDGF	Trombospondina
Prostaglandine E1, E2	Endostatina
TGF- $\alpha$ e TGF- $\beta$	Inibitori dell'attivatore del plasminogeno

---

**Tabella 5.** Caratteristiche generali dei 41 pazienti

	<b>Pazienti affetti da NSCLC (n=31)</b>	<b>Gruppo controllo (n=10)</b>
Età media (range)	69 (52-79)	27 (16-69)
Maschi/Femmine	28/3	9/1
<b>Status fumatore</b>		
Fumatore	38%	60%
Ex fumatore	52%	10%
Non fumatore	10%	30%
<b>Istotipo NSCLC</b>		
Adenocarcinoma	17/31 (55%)	
Carcinoma squamoso	9/31 (29%)	
Carcinoma a grandi cellule	2/31 (6%)	
Altri istotipi	3/31 (10%)	
<b>Stadio</b>		
IA	9/31 (29%)	
IB	9/31 (29%)	
IIA	4/31 (13%)	
IIB	3/31 (10%)	
IIIA	6/31 (19%)	
III B	0	
IV	0	

## 7. FIGURE

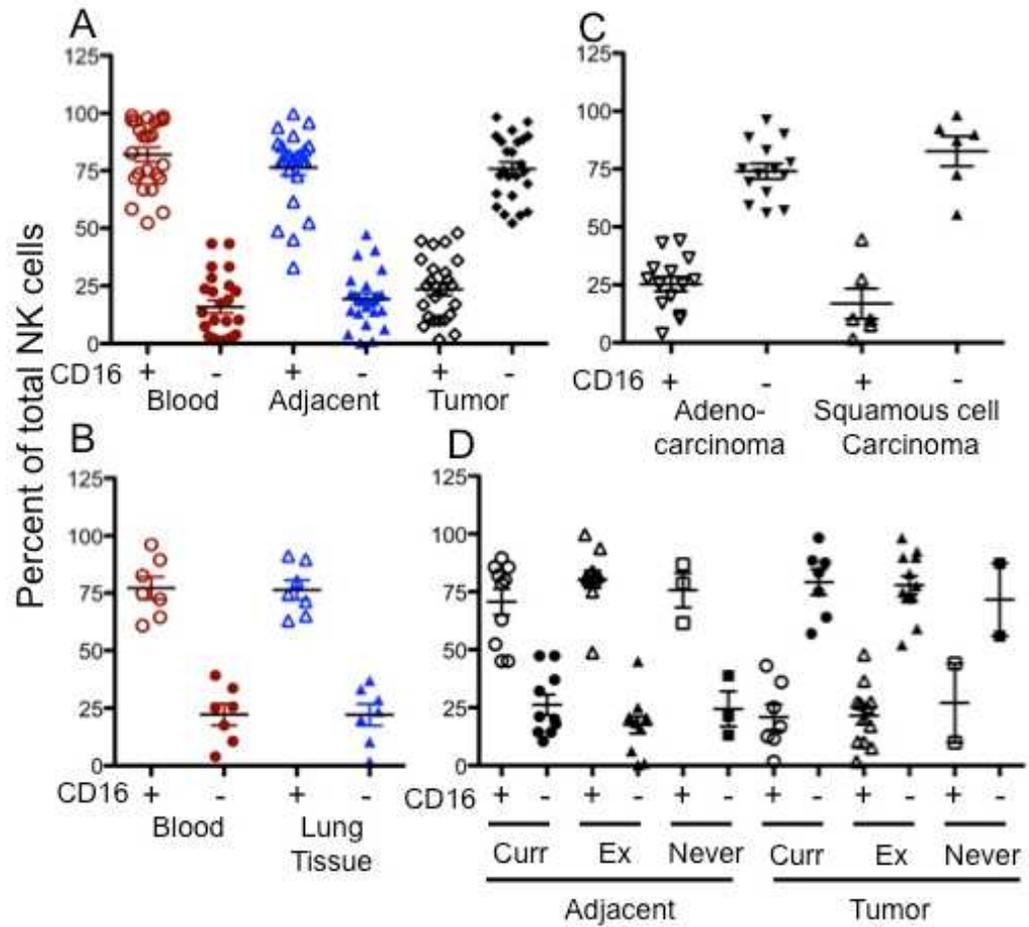


Figura 1. Distribuzione dei subset di cellule Natural Killer in pazienti con NSCLC (A) in relazione all' istotipo (C), allo status di fumatore (D) e relativi controlli derivati da sangue periferico e tessuto sano di soggetti affetti da patologia non neoplastica (B).

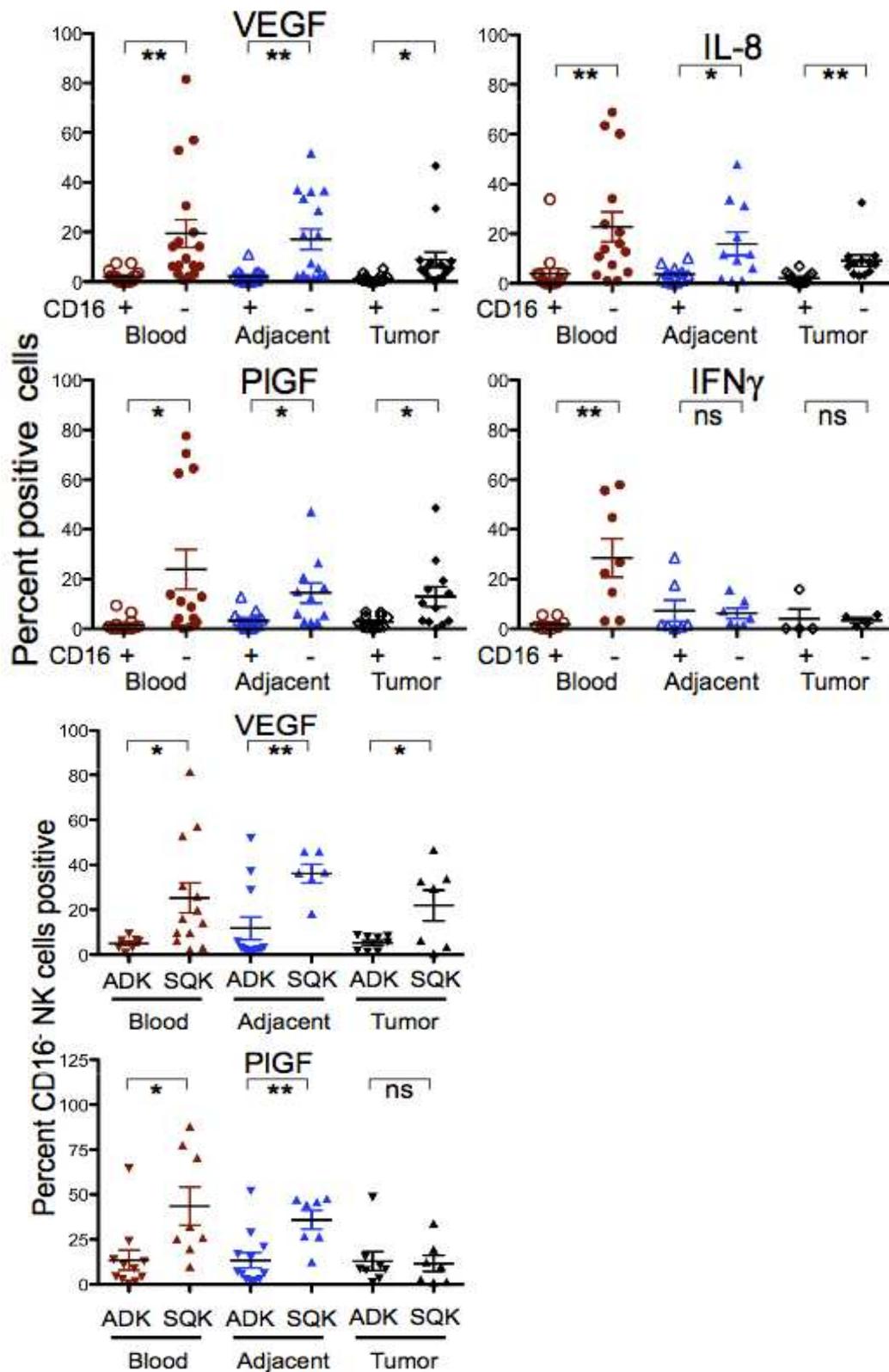


Figura 2. Livelli di citochine pro-angiogeniche (VEGF, PIGF, IL-8) ed anti-angiogeniche (IFN $\gamma$ ) prodotte da cellule NK derivate da pazienti con NSCL e in relazione all'istotipo (ADK=adenocarcinoma, SQK= carcinoma squamoso).

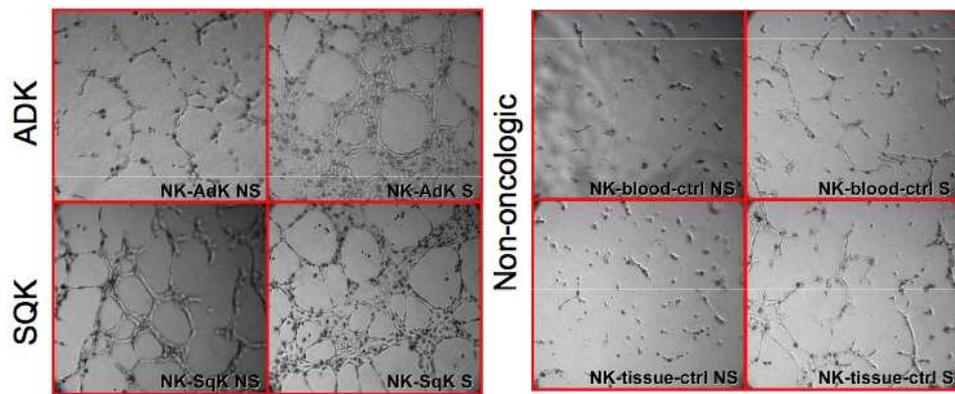
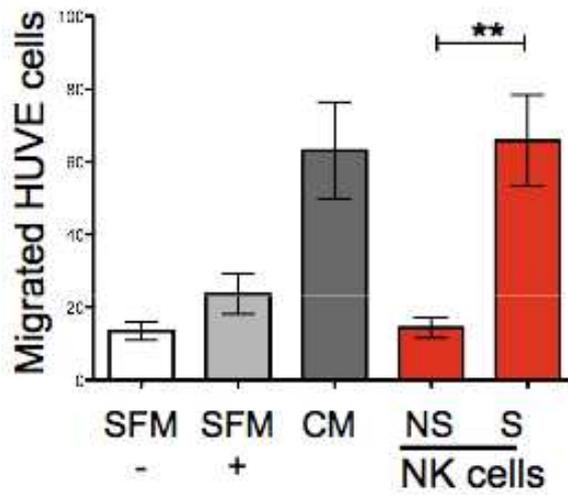


Figura 3. Valutazione del potenziale pro-angiogenico di cellule NK mediante reclutamento di cellule endoteliali (HUVEC) attraverso saggio di chemiotassi ed attivazione dell'endotelio nel costituire strutture simil-capillari (morfogenesi).

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Bilello K, Murin S, Matthay R. Epidemiology, etiology and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002, Vol. 23, p. 1-25.
2. WHO Statistical Information System. WHO Statistical Information System. <http://www.who.int/whosis>.
3. I tumori in Italia. I tumori in Italia. <http://www.tumori.net>.
4. Fraser RS, Muller NL, Parè PD, et al. Malattie del torace, pg 363-456, Elsevier Milano 2006.
5. Alberg A, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007; 132:29S-55S.
6. Spiro, SG. Il carcinoma polmonare. European respiratory Monograph. 1997, Vol. 1
7. Boyle P, Maisonneuve P, Lisbon SN. Epidemiology of lung cancer in European society, 18-24 November 1994. Medical oncology IXX Congress.
8. Beckett WS. Epidemiology and etiology of lung cancer. *Clin Chest Med* 1993;14:1-15.
9. Falcone F, Signora M. Epidemiologia, fattori di rischio e linee di prevenzione. Fonicap-Protocolli di studio, SEDAC Editrice, 1996.
10. La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S, et al. Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 1991;21:94-104.
11. Schottenfeld D. Etiology and epidemiology of lung cancer. In Pass H, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD. *Lung cancer* 2000;20:367-388.
12. Imperatori A, Harrison RN, Leitch DN, et al Lung cancer in Teesside (UK) and Varese (Italy): a comparison of management and survival. *Thorax* 2006;62: 232-239.
13. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med* 2011;32:605-644.
14. Nardi G, Donato F, Bollani A. L'epidemiologia del tumore polmonare. Attuali conoscenze. *L'Igiene Moderna* 1988;90:839-903.
15. Agudo A, Ahrens W, Benhamou E et al. Lung cancer and cigarette smoking in women: a multicenter case-control study in Europe. *Int J Cancer* 2000;88:820-827.
16. Picciocchi A, Granone P,. Epidemiologia. Il cancro del polmone. 1999;2:29-44.

17. Robbins SL, Cotran RS. Le basi patologiche delle malattie VII ed. Elsevier e Masson, 2006. Vol. 2.
18. Mariuzzi GM. Anatomia patologica e correlazioni anatomo-cliniche. Piccin, 2006.
19. Arai T, Kuroishi T, Saito Y, et al and The Japanese Lung Cancer Screening Research Group. Tumor doubling time and prognosis in lung cancer patients: evaluation from chest films and clinical follow-up study. *Jpn J Clin Oncol* 1994;24:199-204.
20. Usuda K, Saito Y, Sagawa M, et al. Tumor doubling time and prognostic assessment of patients with primary lung cancer. *Cancer* 1994; 74:2239-2244.
21. Spratt JS, Spratt JA. The prognostic value measuring the gross linear radial growth of pulmonary metastases and primary pulmonary cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976;71:274-278.
22. Arenberg, D Bronchioloalveolar Lung Cancer ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines II ed. *Chest* 2007;132: 306S-313S
23. Califano R, Abidin AZ, Peck R, et al. Management of small cell lung cancer: recent developments for optimal care. *Drugs* 2012;72:471-490.
24. Graham EA, Singer JJ. Successful removal of an entire lung for carcinoma of the bronchus. *Ca Cancer J Clin* 1974;24:238-242.
25. Bueno R, Richards WG, Skanson SJ et al. Nodal stage after induction therapy for stage IIIA lung cancer determines patient survival. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1826-1831.
26. Hillinger S, Weder W. Extended surgical resection in stage III non-small cell lung cancer. *Front Radiat Ther Oncol* 2010;42:115-121.
27. Lapar DJ, Bhamidipati CM, Lau CL et al. The society of thoracic surgeons general thoracic surgery database: establishing generalizability to national lung cancer resection outcomes. *Ann Thorac Surg* 2012;94:216-221.
28. Alberts WM. Diagnosis and management of lung cancer executive summary: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:S1-S19.

29. Goldstraw P, Ball D, Jett JR et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2011;378:1727-1740.
30. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660.
31. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27-31.
32. Altieri DC. Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. *J Immunol* 1991;147:1891-1898.
33. Persano L, Crescenzi M, Indraccolo S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol Aspects Med* 2007;28:87-114.
34. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
35. Ferrara N, Kerbel Rs. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438: 967-974.
36. Folkman J. Angiogenesis. *Annual review of medicine* 2006;57: 1-18.
37. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100: 57-70.
38. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86: 353-364.
39. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-248.
40. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.
41. Grunewald M, Avraham I, Bachar-Lustig E et al. VEGF- induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124:175-189.
42. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P et al. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: from promiscuity to surrogate marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 2006;6:835-845.

43. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N et al. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287-1295.
44. Noonan Dm, De Lerma Barbaro A, Vannini N, et al. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: Decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27: 31-40.
45. Albini A, Noonan Dm, Ferrari N. Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clin Cancer Res* 2007;13: 4320-4325.
46. De Visser Ke, Eichten A, Coussens Lm. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6:24-37.
47. Albini A, Sporn MB, The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2007;7:139-147.
48. Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 2005;65:10637-10641.
49. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-217.
50. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-545.
51. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12: 1065-1074.
52. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990;76:2421-2438.
53. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22:633-640.
54. Katakai A, Scheid P, Piet M, Marie B, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med* 2002;140:320-328.

55. Carrega P, Morandi B, Costa R, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 2008;112:863-875.
56. Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073-1081.
57. Vivier E, Tomasello M, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9:503-510.
58. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's role in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-1570.
59. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 2010;22:231-237.
60. Qian BZ, Pollard JW. Macrophages diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39-51.