

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**  
**“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Farmaceutiche**

**TESI DI LAUREA**

*Plasticità funzionale dei neutrofili:  
studio in vitro in modelli tumorali umani*

Relatore

*Prof.ssa Silvia Fallarini*

Candidato

*Michela Moglia*

Correlatore

*Dott.ssa Gaia Lesca*

Anno Accademico 2024-2025

Sessione straordinaria

## **LISTA DELLE ABBREVIAZIONE**

**ADCC:** Citotossicità anticorpo dipendente

**APCs:** Cellule presentanti l'antigene

**API-1:** Proteina di attivazione 1

**ARG-1:** Arginasi

**BCR:** Recettore per i linfociti B

**COX-2:** Cicloossigenasi- 2

**CSF-1:** Fattore stimolante colonie 1

**CTL:** Linfociti T citotossici

**DAMP:** Profili molecolari associati ai patogeni

**DC:** Cellule dendritiche

**EMT:** Transizione epitelio-mesenchimale

**GM-CSF/G-CSF:** Fattore stimolante colonie di granulociti e macrofagi

**HSP:** Heat shock protein

**HSPC:** Cellule staminali progenitrici ematopoietiche

**ICAM:** molecole di superficie

**IL:** Interluchina

**INF- $\gamma$ :** Interferone gamma pro-infiammatorio

**IRF:** Fattore di risposta degli interferoni

**LPS:** lipolisaccaride

**MDSC:** Cellule soppressorie di derivazione mieloide

**MHC:** Complesso Maggiore di istocompatibilità

**MMP:** Metallo-proteasi di matrice

**MPO:** Mieloperossidasi

**NE:** Elastasi neurofilica

**NET:** Trappole extracellulari dei neutrofilo

**NF- $\kappa$ b:** Fattore nucleare

**NK:** Cellule Natural Killer

**NLR:** Nod-Like Receptors

**PAMP:** profili molecolari associati al danno

**PMA:** Acetato di forbolo meristato

**PMN:** Neutrofilo polimorfonucleati

**PRR:** Pattern Recognition Receptors

**RE:** Reticolo endoplasmatico

**RLR:** Rig-like Receptors

**RNI:** Intermedi reattivi dell'azoto

**ROS:** Specie reattive dell'ossigeno

**SI:** Sistema immunitario

**TA:** Antigene tumorale

**TAM:** Macrofagi associati a tumore

**TAN:** Neutrofilo associati a tumore

**TCR:** Recettore per i linfociti T

**TH-1:** Cellule T-helper di tipo 1

**TLR:** Toll-like Receptors

**TME:** Microambiente tumorale

**TNF:** Fattore di necrosi tumorale

**T-reg:** Linfociti T regolatori

**VEGF:** Fattore di crescita dell'endotelio vascolare

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>1.1 Il sistema immunitario</b> .....	3
<b>1.1.1 Sistema immunitario innato</b> .....	4
<b>1.1.2 Sistema immunitario adattativo</b> .....	6
<b>1.2 Tumori e Immunità</b> .....	7
<b>1.2.1 Tumorigenesi associata all’infiammazione</b> .....	8
<b>1.2.2 Immunosorveglianza e Immunoediting</b> .....	10
<b>1.3 Neutrofili: cellule sentinella della risposta immunitaria</b> .....	12
<b>1.3.1 Granulociti: classificazione e caratteristiche principali</b> .....	13
<b>1.3.2 Il processo di granulopoiesi</b> .....	14
<b>1.3.3 Reclutamento e migrazione dei neutrofili nei tessuti</b> .....	15
<b>1.3.4 Funzioni effettrici dei neutrofili</b> .....	16
<b>1.4 Tumore e microambiente: modulazione del ruolo dei neutrofili</b> .....	18
<b>1.4.1 Plasticità funzionale dei neutrofili</b> .....	19
<b>1.4.2 Il contributo dei neutrofili nella progressione tumorale</b> .....	20
<b>1.4.3 Neutrofili come nuova strategia terapeutica</b> .....	22
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	24
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	28
<b>3.1 Colture cellulari</b> .....	30
<b>3.2 Isolamento neutrofili</b> .....	31
<b>3.3 Western Blot</b> .....	33
<b>3.4 Elisa</b> .....	34
<b>3.5 Induzione NET ed immunocitochimica</b> .....	36
<b>3.6 Immunocitochimica (ICC)</b> .....	36
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	38
<b>4.1 Valutazione della plasticità funzionale dei neutrofili</b> .....	40
<b>4.1.1 Polarizzazione dei neutrofili</b> .....	41
<b>4.2 Valutazione espressione IL-8 mediante analisi ELISA</b> .....	43
<b>4.3 Valutazione espressione TNF-<math>\alpha</math> mediante analisi ELISA</b> .....	45
<b>4.4 Valutazione espressione MMP-9 mediante analisi Western Blot</b> .....	46

<b>4.5</b>	<b>Valutazione espressione ARG-1 mediante analisi Western Blot.....</b>	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Visualizzazione del rilascio di NETs post induzione con PMA .....</b>	<b>49</b>
<b>5.</b>	<b><i>CONCLUSIONI</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b><i>BIBLIOGRAFIA</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b><i>RINGRAZIAMENTI</i> .....</b>	<b>62</b>

## ***1. INTRODUZIONE***

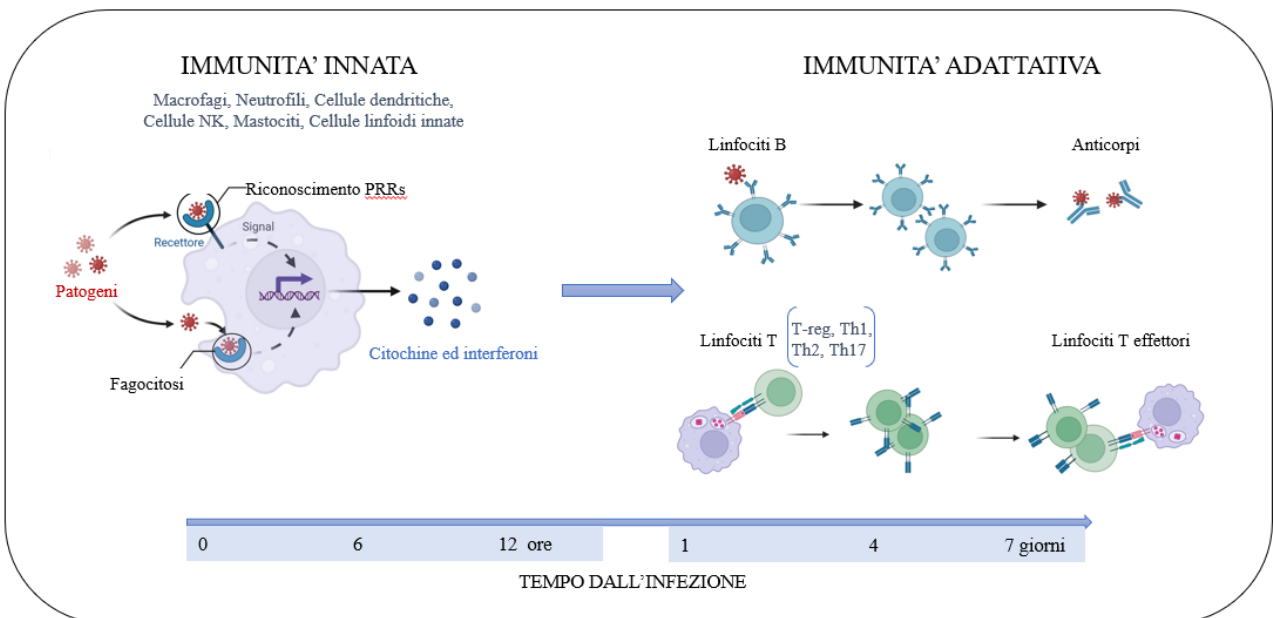


## 1.1 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario (SI) è costituito da cellule e molecole la cui funzione fisiologica è quella di attivare una risposta immunitaria garantendo la difesa da agenti estranei potenzialmente dannosi per l'individuo.

Il SI si divide in sistema immunitario innato e sistema immunitario adattativo. Entrambe le componenti sono strettamente interconnesse tra di loro in quanto, l'immunità innata rappresenta la prima linea di difesa dell'ospite ed è in grado di fornire segnali di attivazione all'immunità adattativa, che riconoscendo specifici antigeni diventa più efficace nell'eliminazione dei microrganismi garantendo una maggiore funzionalità della risposta.

La risposta immunitaria viene controllata da meccanismi di feedback positivo, capaci di determinare l'espansione e la differenziazione dei linfociti effettori fino all'eradicazione dell'infezione. Contemporaneamente, vengono innescate strategie di controllo attraverso l'espressione di recettori inibitori, l'azione dei linfociti T regolatori e la secrezione di citochine immunosoppressive, volte ad impedire l'eccessiva attività linfocitaria, andando a prevenire risposte immunopatologiche, danni ai tessuti e risposte autoimmuni nei confronti di antigeni self.<sup>1</sup>



**Figura 1. Immunità innata e adattativa.** Rappresentazione schematica delle risposte innate e adattative attivate in seguito alla presenza di un patogeno. La cinetica delle risposte immunitarie innate e adattative può variare a seconda delle diverse infezioni

### 1.1.1 Sistema immunitario innato

Il sistema immunitario innato si attiva mediante il riconoscimento, tramite recettori, di strutture molecolari condivise da classi diverse di microrganismi.

È costituito da tre componenti:

- le barriere chimiche e fisiche, rappresentate dalla cute e dagli epitelii delle mucose appartenenti al tratto respiratorio e gastro-intestinale, in grado di bloccare l'ingresso di microrganismi;
- componente cellulare che comprende: cellule fagocitiche di cui fanno parte macrofagi e neutrofilii, cellule dendritiche (DC), cellule natural killer (NK), mastociti e cellule linfoidi innate;
- proteine del sangue, ovvero il sistema del complemento ed altri mediatori dell'infiammazione.

Le cellule del sistema innato sono in grado di attivarsi mediante il riconoscimento di strutture come i profili molecolari associati ai patogeni (PAMP), espressi da virus, funghi e batteri Gram+ e Gram-. Esempi possono essere: lipopolisaccaride (LPS), acido lipoteicoico, peptidoglicano, oligosaccaridi e acidi nucleici. Ma anche attraverso il riconoscimento di profili molecolari associati al danno (DAMP), ossia molecole endogene rilasciate da cellule danneggiate o morte, il cui danno può essere di natura infettiva o non infettiva. Un esempio sono le Heat Shock proteine (HSP), che in condizioni fisiologiche svolgono un ruolo come chaperon molecolari permettendo il corretto ripiegamento della proteina e la protezione della cellula da fonti di stress come calore, ipossia o infezione.

Sia i PAMP che i DAMP vengono riconosciuti dai *Pattern Recognition Receptors* (PRR), in particolare dai recettori Toll-Like (TLR), espressi su macrofagi, cellule dendritiche e neutrofilii, che in seguito al legame con i ligandi, attivano fattori di trascrizione volti a promuovere la risposta immunitaria.

Tra i fattori di trascrizione attivati dai TLR troviamo:

- il fattore nucleare NF- $\kappa$ b, che traslocando nel nucleo induce la trascrizione di citochine pro-infiammatorie, come il *Tumor Necrosis Factor* (TNF) e l'interleuchina 1 (IL-1) e chemochine; questo fattore svolge un ruolo centrale nell'induzione dell'infiammazione;

- la proteina di attivazione 1 (AP-1) coopera con NF- $\kappa$ B contribuendo all'amplificazione e al mantenimento della risposta immunitaria attraverso la regolazione dell'espressione di citochine, chemochine e mediatori dell'infiammazione;
- il fattore di risposta degli interferoni (IRF), in particolare IRF3 e IRF7, coinvolti nell'induzione della trascrizione degli interferoni di tipo 1 (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ).

L'attivazione coordinata di questi tre componenti permette ai TLR di avviare l'infiammazione, e quindi indurre risposte antivirali, promuovere la maturazione di cellule dendritiche e guidare l'attivazione dell'immunità adattativa

Oltre ai più noti precedentemente citati esistono altri recettori coinvolti nel riconoscimento di patogeni o danno cellulare. Tra questi ultimi abbiamo i recettori NOD-like (NLR), capaci di intercettare e riconoscere patogeni intracellulari, amplificando la risposta immunitaria dell'ospite. Quelli di maggiore interesse sono NOD-1 e NOD-2, espressi nel citosol, riconoscono principalmente i peptidoglicani batterici. NLR contribuiscono alla formazione dell'inflammasoma, un complesso multiproteico citosolico capace di promuovere una potente risposta infiammatoria grazie all'induzione della maturazione di citochine infiammatorie come IL-1 $\beta$  e IL-18.

Recettori come i RIG-like (RLR) e i sensori per il DNA localizzati nel citosol che sono in grado di riconoscere il DNA microbico o rilasciato dal mitocondrio danneggiato, promuovendo sia la risposta antimicrobica che l'autofagia e la produzione di interferone di tipo I; in questo effetto gioca un ruolo rilevante STING, ossia una proteina transmembrana localizzata nel reticolo endoplasmatico (RE) che legandosi con cGAMP attiva TBK1, che fosforilerà IRF3, inducendo l'espressione dei geni dell'interferone di tipo 1.

Le risposte immunitarie innate, quindi, vengono innescate successivamente al riconoscimento del segnale di danno tramite i PRR, che attraverso la produzione di fattori trascrizionali, permettono il rilascio di molecole solubili in grado di attivare le cellule specializzate dell'immunità innata. Questo comporta l'insorgenza di un processo infiammatorio in grado sia di controllare l'infezione iniziale, che di fornire i segnali necessari per l'attivazione delle risposte immunitarie adattative, estremamente mirate e potenti.

### 1.1.2 Sistema immunitario adattativo

Il sistema immunitario adattativo è capace di riconoscere antigeni specifici e fornire risposte immunitarie mirate e durature contro patogeni o infezioni ricorrenti, attraverso lo sviluppo della memoria immunologica.

Le cellule coinvolte in questo processo possono determinare l'insorgenza di due risposte differenti: risposta immunitaria umorale, mediata dai linfociti B, produttori di anticorpi; e risposta immunitaria cellulo-mediata, principalmente svolta dai linfociti T.

L'attivazione dei linfociti richiede il riconoscimento da parte del recettore TCR, per i linfociti T e BCR per i linfociti B, di peptidi antigenici presentati da molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) su cellule presentanti l'antigene (APC). I linfociti T riconoscono l'antigene quando presentato da una specifica forma dell'MHC: il complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC-I) viene riconosciuto dalle cellule T CD8<sup>+</sup> mentre l'MHC-II dalle cellule T CD4<sup>+</sup>.

I linfociti T possono essere suddivisi in due principali sottogruppi cellule T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. In seguito al riconoscimento dell'antigene i linfociti CD4<sup>+</sup> differenziano in: 1) cellule T-helper di tipo 1 (Th1) caratterizzate dalla secrezione di interferone gamma pro-infiammatorio (INF-  $\gamma$ ) e da TNF-alpha che forniscono protezione contro virus e batteri; 2) linfociti Th2, coinvolti nella risposta contro parassiti e nelle risposte allergiche; 3) linfociti Th17, secernenti IL-17 e responsabili della difesa contro batteri extracellulari e funghi; 4) T regolatori, fondamentali per la tolleranza immunologica, attraverso il rilascio di citochine soppressive come TGF-beta ed IL-10. I linfociti T CD8<sup>+</sup> invece riconoscono direttamente ed eliminano cellule infettate o neoplastiche.

Differentemente i linfociti B vengono attivati dal riconoscimento diretto dell'antigene attraverso il legame del BCR che determina l'espansione e la differenziazione in plasmacellule, capaci di produrre grandi quantità di anticorpi specifici, oppure, in linfociti B di memoria. Gli anticorpi secreti dalle plasmacellule possiedono lo stesso sito di legame per l'antigene dei recettori delle cellule B, quest'interazione porta un singolo clone di cellule B a produrre anticorpi appartenenti a tre classi differenti: IgA, IgE e IgM.

Affianco ai linfociti B e T è importante ricordare un'altra popolazione di cellule, ovvero le cellule NK che hanno un ruolo effetore simile a quello dei linfociti T citotossici; differentemente, però, non riconoscono un antigene specifico, ed eliminano cellule

tumorali o infette da virus tramite un meccanismo basato sull'equilibrio tra segnali attivatori e inibitori.

## **1.2 Tumori e Immunità**

Sulla base di alcune statistiche prodotte dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il cancro si presenta come una delle tre principali cause di decessi prematuri che si manifestano tra i 30-69 anni. (4) Inoltre, l'aumento e l'invecchiamento della popolazione associati ai fattori di rischio, spesso legati allo sviluppo socioeconomico, hanno portato ad un incremento dell'incidenza. (5)

Il sistema immunitario svolge un ruolo fondamentale nella prevenzione tumorale: grazie alle sue funzioni fisiologiche previene la creazione di un microambiente tumorale (TME) infiammatorio ed elimina le cellule trasformate, riconosciute grazie ad antigeni espressi sulla loro superficie. Tuttavia, il tumore si presenta come una patologia capace di instaurare un rapporto diretto con il SI: modificando le sue funzioni fisiologiche, i tumori sono in grado di eludere la sorveglianza immunologica innescando la formazione di un microambiente favorevole alla progressione neoplastica.

Per ovviare al problema, diventa fondamentale identificare le funzioni delle cellule immunitarie nel microambiente tumorale e nei differenti stadi della malattia.

### **1.2.1 Tumorigenesi associata all'inflammatione**

L'inflammatione è una risposta fisiologica dell'organismo nei confronti di agenti infettivi, fattori di lesione e danni tissutali. Tuttavia, gli stimoli infiammatori prolungati nel tempo possono causare una continua attivazione delle cellule immunitarie, portando così alla cronicizzazione del processo infiammatorio, svolgendo un ruolo chiave sia nello sviluppo che nella progressione tumorale. (5)

L'inizio della tumorigenesi è strettamente correlato all'accumulo di mutazioni genetiche e/o epigenetiche, che influenzano processi come la morte cellulare programmata, la differenziazione e l'adesione cellulare. (8) È stato dimostrato come: a) le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte da cellule mieloidi; b) gli intermedi reattivi dell'azoto (RNI); c) le citochine; e d) i danni al DNA genomico, rappresentano le principali cause di mutagenesi e instabilità genomica che porteranno alla trasformazione in cellule maligne.

Un ruolo cruciale nella progressione tumorale è svolto dalla transizione epitelio-mesenchimale (EMT), processo mediante il quale, grazie al rilascio di mediatori dell'inflammatione come, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 e IL-8, le cellule maligne acquisiscono una maggiore motilità cellulare e attività migratoria, aumentate anche dal rimodellamento dello stroma tumorale, che incide sulla capacità di invasione dei tessuti circostanti. (5) La migrazione avviene seguendo dei gradienti di chemochine di cui le maggiormente espresse sono CXCL1, CXCL5, CXCL-8, CCL2 e CCL5, molecole che svolgono anche un ruolo cruciale nella promozione del processo angiogenetico, nella modifica morfologica delle cellule tumorali, nella migrazione e nell'invasione delle cellule tumorali. (7)

In questo contesto, i macrofagi associati a tumore (TAM) contribuiscono sia a modulare il TME che alla formazione di metastasi, attraverso la produzione di metallo proteasi della matrice (MMP) capaci di degradare le zone di adesione cellulare e i punti di interazione con la matrice extracellulare, facilitando la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali. (5)

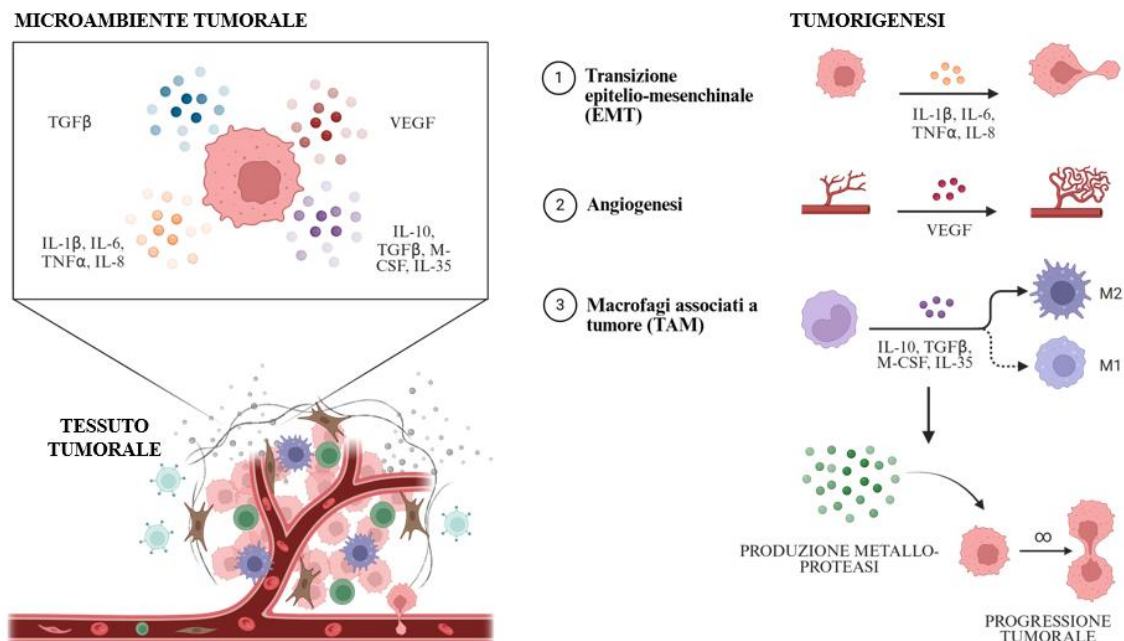
Inoltre, la progressione tumorale è favorita dalla produzione di enzimi e di fattori di crescita, tra cui, il fattore pro-angiogenico e TNF- $\alpha$ . Quest'ultimo aumenta la regolazione di NF- $\kappa$ b nei macrofagi portando ad una proliferazione aggiuntiva del tumore. (8)

La formazione dell'ambiente infiammatorio nel TME e la progressione del tumore sono incentivate, oltre che da chemochine, anche da citochine e fattori di crescita capaci di agire sulle cellule tumorali o sulla modulazione dell'ambiente infiammatorio nel TME.

(5)

Le cellule neoplastiche rilasciano, inoltre, il fattore stimolante colonie-1 (CSF-1) e l'enzima cicloossigenasi-2 (COX-2) coinvolti nel processo infiammatorio e nella promozione dell'angiogenesi tumorale, e molecole come Bcl-2, che inibiscono l'apoptosi. Un ruolo fondamentale è svolto anche da oncogeni come *ras* e *myc*, entrambi coinvolti nella promozione dell'angiogenesi attraverso l'induzione di CXCL8, inoltre, *myc* si occupa anche del rimodellamento dello stroma. (8)

I meccanismi infiammatori descritti rappresentano elementi centrali nella regolazione delle diverse fasi della tumorigenesi, influenzando, attraverso la produzione di citochine, chemochine e fattori di crescita, l'insorgenza e la proliferazione del tumore. In questo contesto, il SI svolge un duplice ruolo, attraverso l'immuno-sorveglianza è in grado di riconoscere ed eliminare le cellule trasformate, dall'altra parte, la presenza di uno stato infiammatorio prolungato può alterare l'efficacia di tali meccanismi permettendo alle cellule di eludere il controllo immunitario. La comprensione dei meccanismi di immunosorveglianza e immunoediting risulta fondamentale per interpretare la complessità biologica del microambiente tumorale.



**Figura 2.** Ruolo dell'infiammazione cronica nella progressione tumorale

### 1.2.2 Immunosorveglianza e Immunoediting

L'immuno-sorveglianza rappresenta uno dei tratti fondamentali del sistema immunitario e consiste nella capacità di riconoscere ed eradicare le cellule trasformate prima che diventino di evidenza clinica. (12)

Questo processo è reso possibile dalla presenza di neo-antigeni specifici presenti sulle cellule tumorali. Questi vengono riconosciuti dalle cellule sentinella come “non-self” capaci di innescare una risposta immunitaria volta ad eliminare i tumori in via di sviluppo. Tuttavia, l'immunosorveglianza rappresenta solo una delle componenti del complesso rapporto tra sistema immunitario e cancro. (10)

Di fatto, è stato dimostrato che alcune cellule tumorali siano in grado di eludere il sistema immunitario grazie allo sviluppo di varianti caratterizzate da una ridotta immunogenicità. Per descrivere il duplice ruolo del sistema immunitario, coinvolto sia nella protezione dell'ospite che nella modellazione del tumore, il termine utilizzato è immunoediting tumorale ed è costituito da tre fasi: eliminazione, equilibrio ed evasione. (9)

L'eliminazione rappresenta la prima fase del processo, qui si osserva la cooperazione tra le risposte immunitarie innate e adattative per promuovere l'eradicazione delle cellule tumorali in via di sviluppo. (12)

In particolare, le cellule trasformate vengono riconosciute dalle cellule effettrici dell'immunità innata, come le cellule NK che rilasciano sia segnali pro-infiammatori, come l'INF- $\gamma$  e perforine capaci di indurre morte apoptotica delle cellule tumorali, sia chemochine come CXCL10, CXCL9 e CXCL11, le quali inibiscono la neo-angiogenesi e quindi si ha un minore apporto di nutrienti alle cellule tumorali. Le chemochine prodotte durante il processo infiammatorio reclutano anche i macrofagi nel sito tumorale che andranno a cooperare per la produzione di INF- $\gamma$  e IL-12, in modo da eliminare una componente cospicua delle cellule trasformate attraverso l'induzione di apoptosi mediata da TNF- $\alpha$ , ROS e RNS. (9)

Parallelamente, le cellule DC attivate e in grado di presentare antigeni tumorali, migrano al linfonodo dove indurranno l'attivazione delle cellule T CD4+ e CD8+. I linfociti, attivati, seguendo un gradiente di chemochine raggiungeranno il sito dove si trovano le cellule tumorali e i CTL elimineranno le cellule tumorali esprimendo l'antigene. (12)

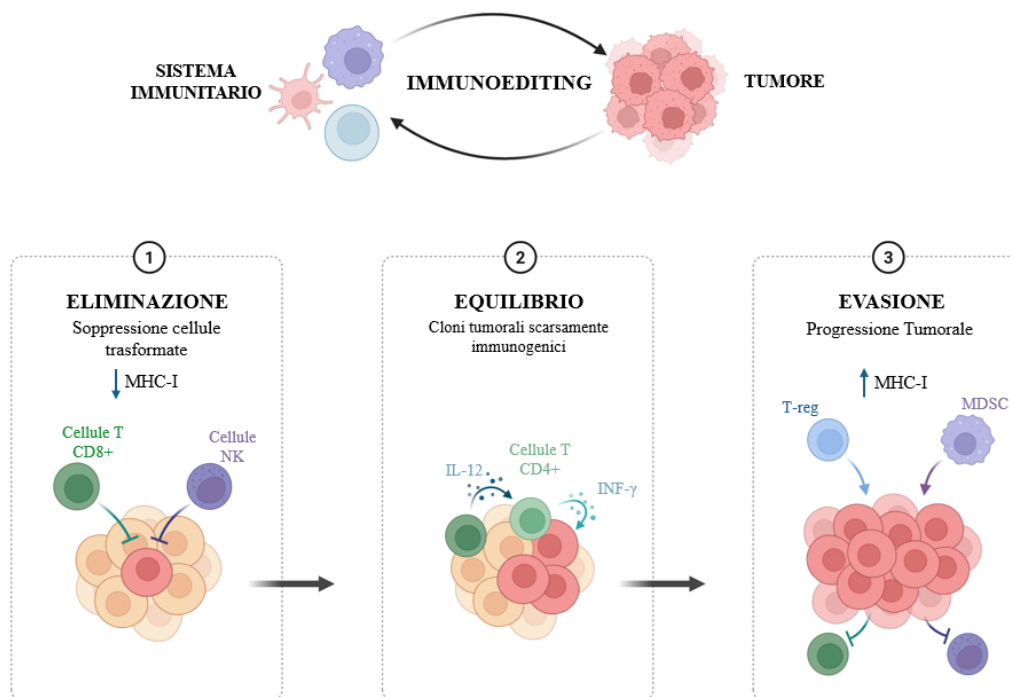
L'equilibrio è la fase più lunga del processo di immunoediting (9). Consiste in una continua interazione tra SI e tumore, durante la quale si assiste, da una parte,

all'eliminazione delle cellule tumorali, e dall'altra, alla produzione di cloni con immunogenicità ridotta resistenti all'attacco immunitario. In questo processo, i linfociti e l'INF- $\gamma$  esercitano una forte pressione selettiva sulle cellule tumorali, eliminando molte varianti derivate dal tumore originario, ma favorendo contemporaneamente l'emergere di nuove popolazioni portatrici di mutazioni resistenti all'attacco immunitario. (12)

Nell'ultima fase di evasione, le cellule tumorali che non sono state eliminate si espandono in maniera incontrollata originando un tumore di evidenza clinica. (9)

I meccanismi alla base del processo di evasione possono essere diversi e includono: a) il ridotto riconoscimento da parte dei CTL dovuto alla mancanza di antigeni tumorali (TA); b) la diminuzione dell'espressione di molecole MHC-I da parte delle cellule tumorali. A questi si aggiunge, lo sviluppo di un ambiente immunosoppressivo veicolato dall'espressione di fattori come TGF- $\beta$  e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) che favorisce la neoangiogenesi. Inoltre, vengono prodotti e rilasciati anche fattori in grado di reclutare popolazioni di cellule con funzione immunosoppressiva come le cellule T-reg, le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) e neutrofili e macrofagi nei quali viene indotto il fenotipo pro-tumorale. (13)

In questo contesto, i neutrofili presentano un ruolo multifunzionale. Nonostante siano essenziali per la difesa dell'ospite, la loro capacità di infiltrare il microambiente tumorale e modificarlo, permette loro di promuovere o inibire la crescita tumorale. (14) In conclusione, l'immunoediting evidenzia il ruolo dinamico svolto dal SI nel controllo della tumorigenesi determinando inizialmente, l'eliminazione delle cellule trasformate, che allo stesso tempo, se prolungato nel tempo, favorisce l'emergere di varianti capaci di eludere la risposta immunitaria. In questo contesto, il TME insieme alle cellule che lo compongono, assume un ruolo centrale. I neutrofili dotati di notevole plasticità funzionale, diventano una componente chiave capace di contribuire alla progressione tumorale e alla modulazione della risposta immunitaria.



**Figura 3.** Immunosorveglianza e Immunoediting: Eliminazione, Equilibrio ed Evasione

### 1.3 Neutrofili: cellule sentinella della risposta immunitaria

I neutrofili costituiscono una delle principali componenti coinvolte nella risposta immunitaria innata. Sono granulociti polimorfonucleati (16) e rappresentano la popolazione più cospicua del torrente circolatorio, ricoprendo il 50-70% dei leucociti totali. (1) Sono sempre stati considerati cellule con una breve emivita in circolo, con una vita media di circa 13 ore. Tuttavia, quando attivati, l'emivita può aumentare, garantendo una presenza prolungata nel sito di infezione. (16)

I neutrofili svolgono un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria acuta, sono tra le prime cellule ad attivarsi ed infiltrare il sito d'infezione riconoscendo e neutralizzando microbi e batteri, grazie all'elevata espressione dei TLR, capaci di riconoscere i PAMPs. (17) In risposta al processo infiammatorio, la loro produzione viene incrementata a livello midollare sotto la guida di fattori di crescita come il CSF, che agisce sulle cellule staminali ematopoietiche promuovendo la proliferazione e la maturazione dei loro precursori. (15) Vengono riconosciuti come vere e proprie cellule sentinella della risposta immunitaria: sono capaci di riconoscere segnali di pericolo, modulare l'ambiente infiammatorio,

attraverso meccanismi effettori quali fagocitosi, produzione di ROS, degranulazione e la formazione di trappole extra-cellulari (NET). Contribuiscono alla regolazione della risposta immunitaria attraverso il rilascio di citochine, chemochine e mediatori lipidici, influenzando il reclutamento e l'attivazione di altre cellule immunitarie. Inoltre, la loro plasticità funzionale, che varia a seconda del contesto microambientale e patologico, permette di adattare la loro risposta alle esigenze dell'organismo. (1)

### **1.3.1 Granulociti: classificazione e caratteristiche principali**

I granulociti sono caratterizzati da nuclei segmentati o lobati di notevoli dimensioni e dalla presenza di granuli specifici. La colorazione dei granuli permette di distinguere i diversi sottotipi cellulari appartenenti a questa classe, ossia, neutrofilo, eosinofilo e basofilo.

I neutrofilo rappresentano il sottotipo più abbondante nel torrente circolatorio, tanto da ricoprire il 50-70% dei leucociti circolanti. Il loro nucleo è polilobato, con 3-5 lobi connessi da sottili segmenti nucleari. Sono cellule antibatteriche capaci di eliminare patogeni attraverso meccanismi di fagocitosi, digestione e rilascio di sostanze tossiche come l'ipoclorito (HClO) e l'anione superossido ( $O_2^-$ ), tanto da formare una zona letale esterna attorno al patogeno per facilitarne l'eliminazione.

Gli eosinofili costituiscono una quota ridotta tra il 2-4% dei leucociti circolanti. Il loro nucleo è bilobato connesso da un sottile segmento, mentre il citoplasma appare ricco di granuli specifici. Il loro aumento esponenziale è correlato a reazioni allergiche, infezioni parassitarie e malattie associate alla milza e al sistema nervoso. Sono in grado di discernere composti chimici che indeboliscono o eliminano parassiti, fagocitando ed eliminando complessi antigene-anticorpo e allergeni, contribuendo alla modulazione della risposta immunitaria.

Per finire, i basofili, rappresentano lo 0,5% dei leucociti totali. Sono riconosciuti grazie alla presenza di granuli specifici di grosse dimensioni e disomogenei nel citoplasma che, spesso, nascondono il nucleo principale, caratterizzato da una forma ad S o U. I basofili secernono composti chimici di difesa come l'istamina (vasodilatatore), l'eparina (anticoagulante) e segnali chimici che richiamano eosinofili e neutrofilo nel sito di infezione. (21)

I granulociti rappresentano, quindi, una componente fondamentale del sistema immunitario capace di reagire a infezioni, parassiti e stimoli allergici attraverso il riconoscimento di marcatori comuni. Il processo di produzione dei granulociti prende il nome di granulopoiesi e avviene nel midollo osseo, garantisce il rinnovamento costante dei granulociti a partire da cellule staminali ematopoietiche, mantenendo l'equilibrio immunitario.

### **1.3.2 Il processo di granulopoiesi**

I neutrofili originano nel midollo osseo dal processo di granulopoiesi, a causa della loro breve emivita, sono sottoposti ad una continua sostituzione per garantire la loro funzione di sentinelle del sistema immunitario. (20)

Il processo è caratterizzato da una serie di passaggi di maturazione a partire dalle cellule staminali progenitrici ematopoietiche (HSPC) (20), che attraverso la regolazione da parte del fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF), ne permette la differenziazione. (18)

I mieloblasti, cellule staminali unipotenti, si differenziano in promielociti caratterizzati da un nucleo tondeggiante e dalla presenza sia di granuli azzurrofilo, contenenti mieloperossidasi, che da microperossisomi contenenti catalasi.

I promielociti daranno origine a cellule più piccole chiamate mielociti, residenti nel midollo osseo, presentano nuclei ovali localizzati unilaterali. I mielociti continuano a dividersi contribuendo al pool mitotico dei neutrofili, mostrando una progressiva riduzione del numero dei granuli azzurrofilo e un aumento dei granuli specifici.

Successivamente, si osserva la comparsa dei metamielociti, cellule molto piccole che non sono più in grado di effettuare mitosi, ma che si differenzieranno in cellule a banda, ossia la penultima forma immatura dei neutrofili. La fase finale dello sviluppo porterà alla maturazione in cellule segmentate o neutrofili polimorfonucleati (PMN) con nuclei lobati collegati da piccoli segmenti di cromatina.

Durante la granulopoiesi, non solo cambia la morfologia del nucleo, ma anche l'espressione di alcuni marcatori di superficie, di componenti del citoscheletro e del contenuto dei granuli, come ad esempio i recettori del peptide N-formil che non sono espressi sui mieloblasti, ma compaiono progressivamente durante la maturazione. Le vescicole secretorie si arricchiscono di proteine plasmatiche e recettori di membrana che andranno a supportare le funzioni di endocitosi dei PMN maturi.

I PMN presenti nel midollo osseo vengono immessi in circolo attraverso l'attivazione di CXCR2 che ne promuove la mobilizzazione, mentre l'interazione tra CXCL12 e CXCR4 ha la funzione di trattenere cellule a banda e PMN nel midollo osseo regolando l'equilibrio tra midollo osseo e circolo periferico.

La breve emivita dei PMN spiega la loro elevata produzione, negli adulti il tempo di produzione di un neutrofilo maturo è di 5-8 giorni, la cui emivita nel circolo sanguigno oscillerà tra le 6 e le 19 ore. I PMN circolanti svolgono la funzione di sentinella per rilevare i siti di infezione o danno tissutale, tanto da essere tra le prime cellule ad essere reclutate nel sito di interesse, garantendo una risposta immunitaria rapida ed efficace. (18)

### **1.3.3 Reclutamento e migrazione dei neutrofilii nei tessuti**

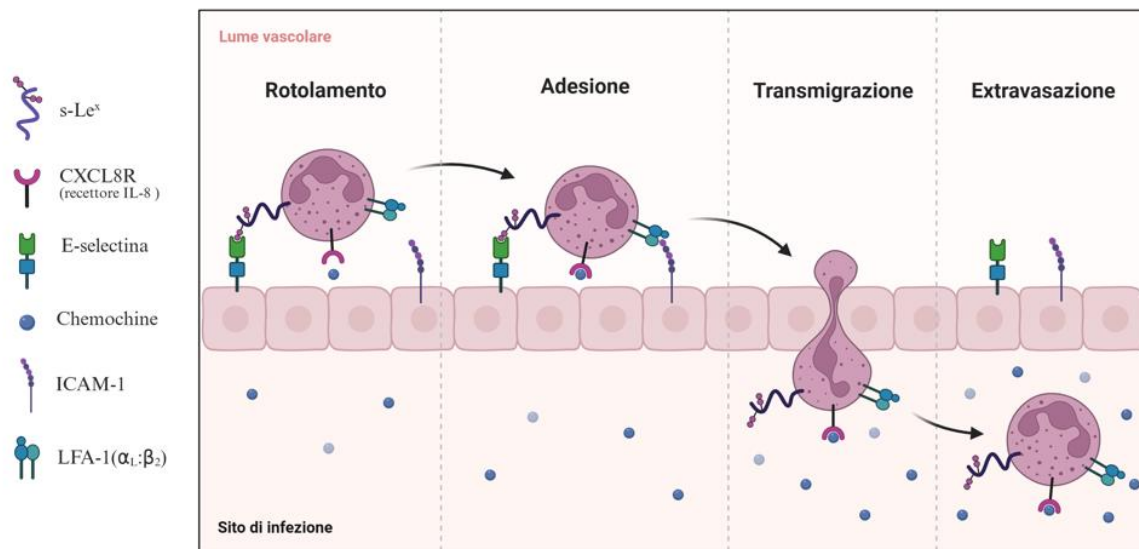
Quando i neutrofilii vengono immessi in circolo, guidati da gradienti chemiotattici (17), sono i primi leucociti a raggiungere il sito infiammatorio per permettere l'eliminazione dei patogeni presenti. Nella maggior parte dei tessuti, il loro reclutamento prende il nome di extra-vasazione, ed è indotto sia da cambiamenti sulla superficie endoteliale da parte dei mediatori dell'infiammazione, rilasciati in seguito al contatto con i patogeni, sia dal loro riconoscimento mediante i PRR. Questi stimoli aumentano l'espressione di molecole di adesione, come la P-selectina e la E-selectina che una volta espresse sulla superficie endoteliale, effettuano contatto con i propri ligandi glicosilati determinando la cattura dei neutrofilii liberi e il loro rotolamento lungo la direzione del flusso ematico. Questo processo facilita il loro contatto con l'endotelio permettendo di entrare in contatto con chemochine per indurre l'attivazione, che può essere stimolata sia da citochine pro-infiammatorie, come il TNF- $\alpha$  e l'IL-1 $\beta$ , sia in seguito al riconoscimento di PAMP o da fattori di crescita.

Il legame tra le chemochine e i loro recettori, come CXCL8R e CXCR2, permette l'attivazione di integrine come LFA-1, che subendo un cambiamento conformazionale permette il legame con molecole di superficie come ICAM1 e ICAM2.

Il legame tra le integrine e ICAM-1 è essenziale per una salda adesione in modo da cessare la fase di rotolamento dei neutrofilii, che si insinueranno tra le cellule endoteliali della parete.

La trasmigrazione per lasciare il torrente circolatorio richiede, inoltre, il legame tra integrine e CAM, nonché tra molecole di adesione come CD31, espresse sia dalle giunzioni endoteliali che dai neutrofilii.

Una volta attraversata la barriera endoteliale, i neutrofili, essendo in grado di produrre numerose MMP, penetrano nella membrana basale e grazie alle chemochine migrano attraverso i tessuti. Dopo l'eliminazione dei patogeni, i neutrofili up-regolano CXCR4 per avviare il processo apoptotico, i cui detriti verranno fagocitati dai macrofagi, garantendo la risoluzione dell'infiammazione e il ripristino dell'omeostasi tissutale. (16)



**Figura 4.** Rappresentazione schematica del processo di reclutamento e migrazione dei neutrofili nei tessuti

#### 1.3.4 Funzioni effettrici dei neutrofili

I neutrofili svolgono importanti funzioni attraverso dei pathway regolatori, tra queste troviamo: la degranolazione, la fagocitosi, la produzione di ROS, rilascio di proteasi, NET e peptidi antimicrobici. Inoltre, partecipano attivamente alla modulazione della risposta immunitaria adattativa, interagendo con altre cellule del sistema immunitario. (24)

I granuli rilasciati dai neutrofili permettono, da una parte, l'eliminazione dei patogeni attraverso la degradazione delle membrane e del DNA microbico, dall'altro, reclutano cellule immunitarie, come le DC e i macrofagi, per eradicare l'infezione.

Oltre alle proprietà antimicrobiche, i granuli contengono fattori di crescita e proteine di matrice extracellulare che promuovono la riparazione e la rigenerazione tissutale. Tuttavia, l'eccessiva degranolazione può contribuire a rendere cronica l'infiammazione.

Durante il loro processo di granulazione i granuli vengono suddivisi in:

- granuli primari o azzurrofilo: contenenti MPO, elastasi neutrofilica (NE) e catepsina G;
- granuli secondari o specifici: esprimono la lattoferrina e CD66b, una proteina di superficie cellulare;
- granuli terziari o gelatinasi: l'esempio principale sono le MMP-9, enzima coinvolto nella degradazione delle proteine di matrice extracellulare. La sua secrezione è fondamentale nei processi patologici e fisiologici inclusi il rimodellamento tissutale, il *wound healing* e il cancro. (25)

Quando i neutrofilo riconoscono i PAMP tramite i TLR, sono in grado di rinchiudere il patogeno in un fagosoma svolgendo un processo definito fagocitosi. (26) Il rimodellamento dell'actina, necessario per effettuare questo processo, comporta anche la traslocazione dei granuli azzurrofilo e specifici vicino al fagosoma, aumentando la concentrazione di calcio intracellulare e la consecutiva formazione di pori nel fagosoma. Questo permette la fusione con i granuli e l'esposizione del patogeno ai peptidi antimicrobici. Inoltre, il reclutamento del complesso NADPH ossidasi nel fagosoma promuove l'uccisione del patogeno attraverso la produzione di ROS. (25)

Un altro meccanismo messo in atto dai neutrofilo è la formazione delle NET, ossia, fibrille di cromatina nucleare, associate ad istoni citrullinati (H3) e proteine contenute nei granuli primari, secondari e terziari, rilasciate nell'ambiente extracellulare. Queste consentono di intrappolare i patogeni e di eliminarli mediante il rilascio di sostanze microbicide.

Il rilascio delle NETs può essere distinto in: NETosi suicida e NETosi vitale. La NETosi suicida è indotta dall'attivazione del pathway Raf-MEK-ERK e dalla produzione di ROS, dipendente dalla NADPH ossidasi, induce la citrullinazione degli istoni dipendente dalla peptidilarginina deaminasi 4 (PAD4) decondensando il DNA. Il materiale nucleare, insieme a MPO e NE, viene rilasciato nell'ambiente extra-cellulare mediante la rottura della membrana citoplasmatica e portando alla morte del neutrofilo, questo processo si attiva per stimoli forti come citochine pro-infiammatorie. La NETosi vitale può invece essere indotta dal riconoscimento di PAMP tramite TLR o da citochine come IL-8 e GM-CSF, qui il DNA viene trasportato in vescicole nello spazio extracellulare, attraverso la fusione con la membrana plasmatica senza comprometterne la sua integrità e quindi mantenendo vitale il neutrofilo. (28)

Le NETs sono coinvolte anche nelle malattie autoimmuni dove i neutrofili sono responsabili dell'effetto citotossico. Nonostante non sia ben chiara la funzione della NET nella progressione tumorale, recenti studi suggeriscono la loro implicazione nel processo metastatico, dove intrappolano le cellule tumorali circolanti in siti metastatici distanti, e alla progressione tumorale nei siti primari attraverso il rilascio di proteine biologicamente attive. (23)

#### **1.4 Tumore e microambiente: modulazione del ruolo dei neutrofili**

All'interno del TME coesistono molteplici popolazioni cellulari, tra cui cellule immunitarie innate e adattative, cellule stromali e componenti della matrice extra cellulare. (29)

Tra le cellule infiltranti lo stroma tumorale, i TAM sono stati riconosciuti come promotori nella progressione tumorale. Analogamente, i neutrofili reclutati nel TME, acquisiscono un fenotipo specifico definito come neutrofili associati a tumore (TAN) (32). IL TME esercita una forte influenza modulandone la polarizzazione, (29) e sfruttandone la plasticità funzionale, rendendoli mediatori chiave nella trasformazione maligna, nella progressione tumorale e nella regolazione dell'immunità antitumorale. (27)

Il loro reclutamento nel sito tumorale coinvolge l'asse IL-8/CXCR2, cruciale anche nella progressione del cancro e nel potenziale metastatico. IL-8 è una citochina pro-angiogenica coinvolta nella EMT e nei meccanismi di evasione. IL-17, invece, favorisce il reclutamento dei neutrofili nel TME e stimola la secrezione di CXCL1 e CXCL5 da parte delle cellule tumorali, come osservato in modelli di carcinoma mammario, determinandone la progressione. Di conseguenza livelli elevati di IL-17 correlano con una prognosi sfavorevole in termini di sopravvivenza.

Il reclutamento dei neutrofili può essere agevolato anche in condizione ipossiche dal fattore di trascrizione alpha inducibile da ipossia (HIF1- $\alpha$ ), da VEGF e dall'espressione di MMP-9 e citochine come TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ . (34)

L'interazione tra i TAN e le cellule tumorali influenza la loro plasticità permettendo di svolgere un duplice ruolo nel TME, dove i fattori rilasciati influenzano la polarizzazione verso due fenotipi differenti. (27)

Il fenotipo pro-infiammatorio con attività antitumorale, N1, può essere acquisito tramite l'attivazione dei neutrofili attraverso il G-CSF, e dall'influenza di  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ . (29)

Mentre il fenotipo pro-tumorale N2 è sostenuto dal  $\text{TGF-}\beta$ , che regola le funzioni di chemiotassi e citotossicità dei neutrofili, svolgendo un ruolo cruciale nella progressione neoplastica e nella polarizzazione; il blocco del suo rilascio aumenta l'infiltrazione dei TAN N1 che possono così svolgere un'attività citotossica verso il tumore. (27)

Oltre alla suddivisione appena citata, i TAN possono essere classificati in base alla loro densità. I neutrofili ad alta densità (HDN), si identificano nella polarizzazione N1, mentre quelli a densità inferiore (LDN) nella polarizzazione N2, infatti, la loro presenza aumenta notevolmente in contesti infiammatori e patologici. L'equilibrio tra LDN e HDN potrebbe fornire informazioni su meccanismi patologici tanto da poter essere utilizzati come marcatori prognostici e diagnostici. (31)

#### **1.4.1 Plasticità funzionale dei neutrofili**

Come descritto nel paragrafo precedente, i TAN possono essere classificati come N1, antitumorali e N2, protumorali.

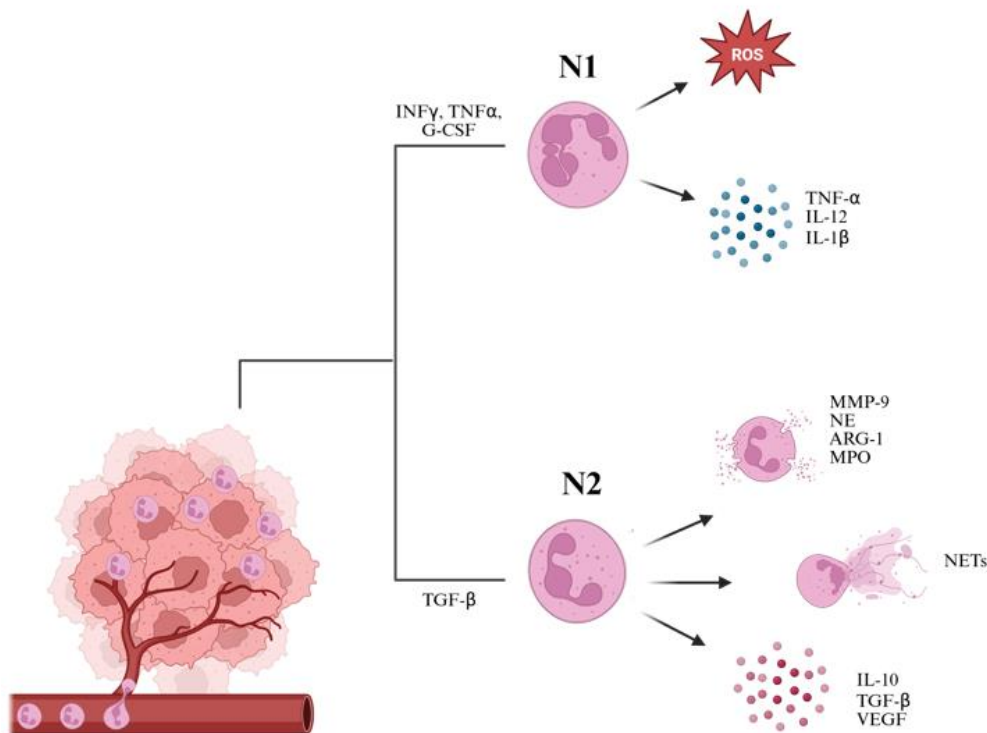
Generalmente, all'inizio della tumorigenesi, i TAN localizzati marginalmente al tumore, presentano fenotipo N1 ma, con la progressione tumorale, vengono reclutati nel nucleo del tumore, e riprogrammati verso un fenotipo immunosoppressivo N2.

La polarizzazione verso il fenotipo N1 è guidata da fattori come l' $\text{INF-}\gamma$ , IL-8, G-CSF,  $\text{TNF-}\alpha$  e sostenuta dall'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e CD-95.

Differentemente, il  $\text{TGF-}\beta$  stimola la polarizzazione verso il fenotipo N2 caratterizzato da una elevata espressione di Arginasi 1 (ARG-1), CCL2, IL-8/CXCL8, e da una maggiore capacità di promuovere l'angiogenesi e la produzione di mediatori dell'infiammazione. (32)

I neutrofili in base al loro ruolo e al loro stato di maturazione possono essere ulteriormente distinti in sottotipi. Durante la progressione tumorale, possono evolvere da un fenotipo antitumorale a sottotipi pro-tumorali che promuovono angiogenesi, secernono chemochine mieloidi o mediatori dell'infiammazione. È stato identificato un sottotipo definito come TAN "ibrido" che presenta caratteristiche simili alle APC, capace di stimolare le cellule T e di contribuire agli effetti antitumorali dei linfociti T  $\text{CD8}^+$ .

Un'ulteriore suddivisione è basata sulla densità dei neutrofili, distinguendoli in HDN e LDN, questi ultimi aumentano in circolo parallelamente alla progressione tumorale, determinando una diminuzione degli HDN. Importanti ricerche sostengono che i TAN sono coinvolti nella promozione tumorale, determinando progressione, recidive, invasione, metastasi e regolazione del TME, presentandosi come nuovi bersagli per la target therapy. (32)



**Figura 5.** Rappresentazione schematica sulla plasticità funzionale dei neutrofili

#### 1.4.2 Il contributo dei neutrofili nella progressione tumorale

I TAN possono essere classificati in neutrofili con fenotipo N1, con attività antitumorale, o N2, con attività pro-tumorale. Il TGF-β over- espresso è lo stimolo chiave per la polarizzazione N2, infatti, la sua inibizione, induce l'aumento dell'attività pro-infiammatoria dei TAN N1, inclusa l'attivazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup>. (33)

La capacità pro-tumorale è associata alla promozione di neo-vascularizzazione grazie alla secrezione di MMP e VEGF, e all'aumento della capacità migratoria e invasiva delle cellule tumorali attraverso il rilascio di NE, MMP-9 e Catepsina-G, tramite la degradazione dell'ECM e dal contatto diretto con le cellule tumorali. (30)

L'immunosoppressione mediata dai neutrofili è correlata ad un alterato metabolismo della L-arginina, che viene convertita dall'ARG-1 in L-Ornitina, riducendo la disponibilità di L-arginina fondamentale per l'espressione della catena  $\zeta$  del TCR necessaria per l'attivazione dei linfociti. Elevati livelli plasmatici di ARG-1 sono stati osservati in pazienti oncologici.

Nel processo immunosoppressivo sono coinvolti anche i ROS, in particolare il perossido di idrogeno che può sopprimere l'attivazione e la proliferazione delle cellule T inducendo l'apoptosi o inibendo NF- $\kappa$ B o la disponibilità della catena  $\zeta$  del recettore. (35)

La funzione delle cellule T può essere compromessa dall'interazione tra PD-1, espresso dalle stesse, e PDL-1, espresso dai neutrofili, la cui espressione può essere indotta da INF- $\alpha$ , GM-CSF o da condizioni di ipossia, e richiede il contatto cellula-cellula mediato dall'integrina Mac-1 sui neutrofili.

I TAN inibiscono l'attivazione delle cellule NK, e promuovono la proliferazione delle cellule T regolatorie, attraverso la secrezione di CCL17, stabilendo un circuito a feedback positivo tra i neutrofili e le T reg che rinforza l'immunosoppressione. (35)

I neutrofili, inoltre, orchestrano la metastatizzazione, tanto che la crescita del tumore è associata alla presenza di neutrofili in organi distanti dal sito di origine, il cui accumulo dipende dal G-CSF che promuove il fenotipo metastatico migliorando l'angiogenesi e la migrazione delle cellule tumorali. (36)

L'esposizione dei neutrofili al GM-CSF determina la produzione di Oncostatina M, citochina coinvolta nel processo metastatico, agevolato anche dalla presenza di glicosamminoglicano ialuronico prodotto dalle cellule tumorali, attiva i neutrofili, sostenendo la migrazione del tumore. (37)

Infine, le NETosi, contribuiscono alla metastatizzazione attraverso il rilascio di filamenti di materiale nucleare che catturano le cellule tumorali circolanti diffondendole lontano dal sito di origine. I fattori rilasciati dal tumore promuovono lo sviluppo di nicchie pre-metastatiche che facilitano l'infiltrazione dei neutrofili e la deposizione delle NET. (38)

### 1.4.3 Neutrofili come nuova strategia terapeutica

Sebbene i neutrofili svolgono un ruolo pro-tumorale è importante sottolineare anche il loro ruolo come cellule antitumorali, tanto da renderli un potenziale strumento terapeutico.

Attualmente, è fondamentale identificare i fattori del TME che, nelle fasi avanzate della tumorigenesi, inducono la polarizzazione dei neutrofili a N2. Nel contempo si studiano strategie per modulare la loro funzione a vantaggio della risposta antitumorale. Tra queste, sono stati sviluppati approcci per limitare il reclutamento dei neutrofili attraverso l'inibizione dei checkpoint immunitari coinvolti, spesso combinati con il trasferimento di cellule T e l'immunoterapia. (30)

Sono stati sviluppati metodi per promuovere il fenotipo N1 nel TME attraverso la loro attivazione con G-CSF e INF- $\beta$ , stimolando la produzione di citochine pro-infiammatorie citotossiche per le cellule tumorali. Tuttavia, un'attivazione non specifica di queste cellule comporta il rischio di danni tissutali collaterali.

Un'altra strategia terapeutica potrebbe essere l'inibizione di enzimi specifici presenti nei neutrofili e coinvolti nella progressione tumorale. Un esempio è NE, uno studio ha dimostrato che la sua inibizione ha ridotto significativamente la crescita di adenocarcinomi polmonari in modelli murini, un altro esempio è MMP-9 che, quando inibita, porta ad una diminuzione dell'angiogenesi.

L'approccio più promettente coinvolge l'utilizzo di anticorpi monoclonali per attivare la citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC) dei neutrofili, tramite l'attivazione del recettore Fc, stimolando la produzione di ROS e l'attivazione delle cellule NK tramite CD16a. È stato dimostrato che i polimorfismi dei recettori Fc, espressi sui neutrofili, possono funzionare come biomarcatori per ottimizzare l'efficacia degli anticorpi diretti a EGFR. Queste varianti possono quindi influenzare la capacità dei neutrofili di mediare citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC) nei confronti delle cellule tumorali che esprimono EGFR. Inoltre, i neutrofili attivati da INF- $\gamma$  possono eseguire ADCC contro i tumori: CD89 emerge come potente induttore di ADCC da parte dei neutrofili tanto da essere proposto come nuova generazione di mAb per sfruttare il potenziale citotossico dei neutrofili. (31)

Un approccio innovativo consiste nel modulare la differenziazione dei neutrofili circolanti verso un fenotipo antitumorale o utilizzarli per renderli carrier di farmaci, reintroducendoli *in vivo* per colpire selettivamente le cellule tumorali. Grazie

all'espressione delle MMP, e all'espressione del recettore antigenico CAR, i neutrofilii possono infiltrarsi in uno stroma tumorale più denso rispetto alle CAR-T e rilasciare efficacemente il farmaco, con un miglior profilo di sicurezza e capacità di penetrazione, incluso nel contesto della barriera emato-encefalica. (32)

Nel complesso i TAN emergono come componenti altamente plastiche del TME, capaci di svolgere funzioni sia pro che antitumorali in risposta ai segnali rilasciati, tanto che il loro reclutamento, la polarizzazione fenotipica e l'interazione con le altre cellule del TME influenzano significativamente la progressione tumorale, l'immunosoppressione e la metastatizzazione. La comprensione dei meccanismi regolatori dei TAN apre nuove prospettive terapeutiche, rendendoli potenziali bersagli e strumenti per strategie mirate.

## ***2. SCOPO DEL LAVORO***



I neutrofili rappresentano una componente fondamentale dell'immunità innata e costituiscono la popolazione leucocitaria più abbondante.

Deputate principalmente alla difesa contro agenti patogeni, negli ultimi anni è emerso il loro ruolo cruciale anche nel microambiente tumorale. In questo contesto, i neutrofili possono acquisire fenotipi funzionali distinti verso un profilo antitumorale (N1) o pro-tumorale (N2) in risposta ai segnali rilasciati dalle cellule neoplastiche.

Il dialogo tra cellule tumorali e neutrofili avviene attraverso il rilascio di citochine, chemochine e fattori solubili in grado di modulare la funzione effettrice dei neutrofili.

La comprensione dei meccanismi che regolano la polarizzazione dei neutrofili nel microambiente tumorale rappresenta quindi un aspetto cruciale per chiarire il loro contributo alla progressione del tumore e per individuare potenziali target terapeutici.

Il mio progetto di tesi ha avuto l'obiettivo di valutare *in vitro* la polarizzazione dei neutrofili in risposta a stimoli derivanti da tre differenti linee cellulari tumorali: A375, MDA-MB 231 e U87-MG, valutando sia l'effetto dell'interazione cellula-cellula, sia l'interazione con i fattori solubili rilasciati nel medium.

In particolare, è stato valutato l'effetto delle cellule neoplastiche sull'attività dei neutrofili analizzando il rilascio di IL-8 e TNF- $\alpha$  mediante saggio sandwich ELISA, e i livelli di MMP-9 e ARG-1 mediante Western Blot.

L'obiettivo finale dello studio è stato quello di confrontare l'effetto delle diverse linee tumorali sulla modulazione del fenotipo neutrofilico, al fine di comprendere se e in che misura differenti contesti tumorali siano in grado di indirizzare i neutrofili verso un profilo funzionale specifico, contribuendo così alla progressione o al controllo della malattia neoplastica.

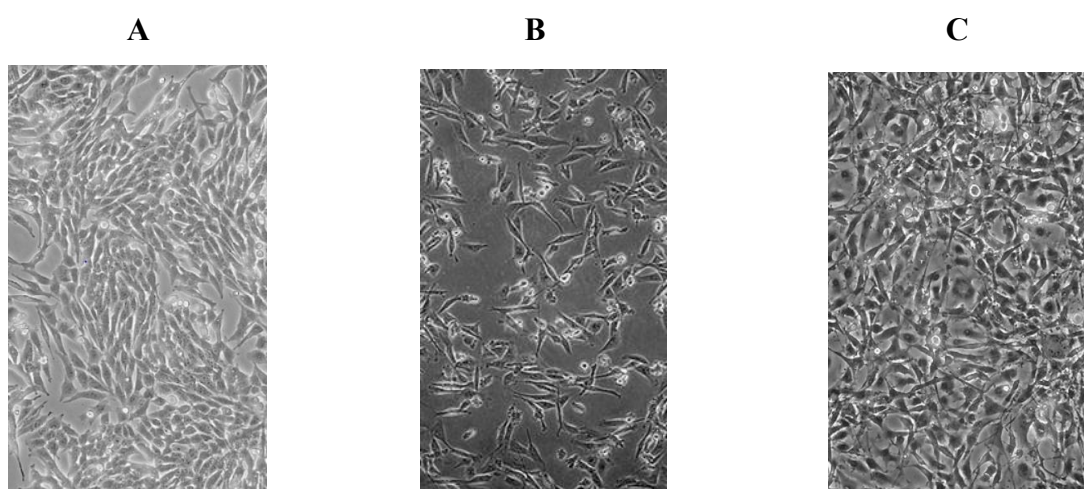


### ***3. MATERIALI E METODI***



### 3.1 Colture cellulari

In questo progetto di tesi sono state utilizzate tre linee cellulari tumorali umane: cellule di melanoma A375, cellule di glioblastoma U87- MG e cellule di carcinoma mammario MDA-MB 231. Sia la linea A375 che MDA-MB 231 sono state coltivate in DMEM completato con 10% FBS, 1% penicillina/streptomicina e 1% di L-glutamina 2mM. La linea U87-MG è invece stata coltivata in EMEM completato come riportato per il terreno precedente. Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37° in atmosfera umidificata come una pressione del 5% di CO<sub>2</sub>. Gli esperimenti sono stati condotti in cappe a flusso laminare verticale in condizioni sterili e con l'utilizzo di materiali sterili.



**Figura 6.** Linee cellulari: A) A375; B) MDA-MB 231; C) U87-MG

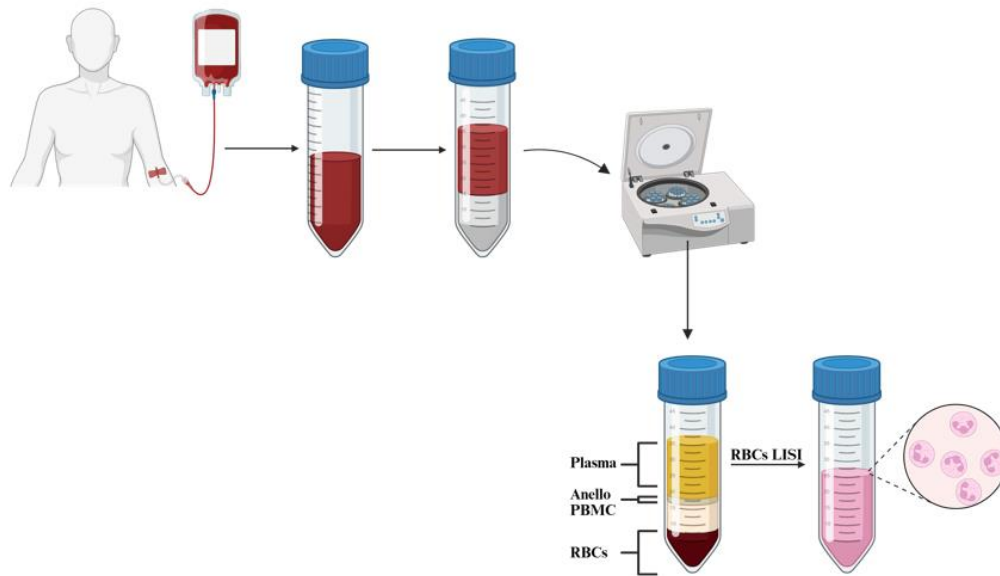
### **3.2 Isolamento neutrofili**

I neutrofili sono stati isolati partendo da buffy coat ottenuti da donatori sani previo consenso informato. Tutte le fasi del protocollo sono state effettuate in condizioni sterili utilizzando cappe a flusso laminare verticale.

Il primo passaggio consiste nella diluizione del buffy coat in rapporto 1:1 con tampone fosfato salino (PBS) 1X, e viene poi aggiunta con rapporto 2:1, una soluzione fisiologica contenente il 3% di destrano per promuovere la sedimentazione degli eritrociti.

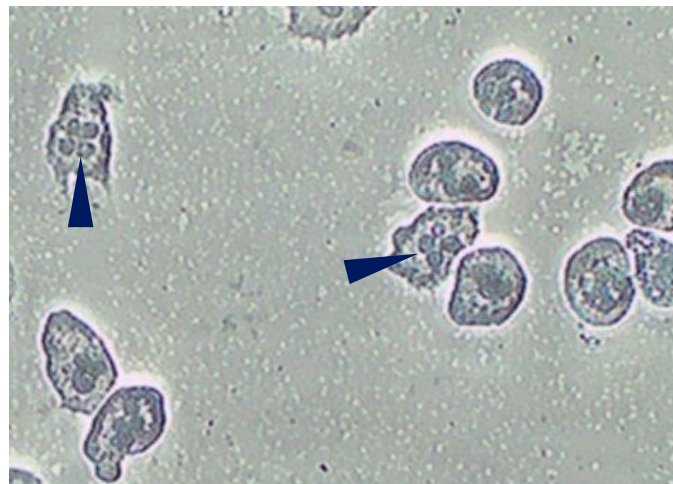
La precipitazione degli eritrociti avviene in circa 30 minuti, ed una volta completata, viene recuperato il surnatante, facendo attenzione a non smuovere il pellet, e trasferito in una falcon pulita che viene centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Terminata la centrifuga, il surnatante viene eliminato ed il pellet risospeso in 8 mL di PBS 1X. In una nuova falcon vengono depositati 4 mL di soluzione Ficoll-Paque sopra i quali si stratifica il pellet precedentemente risospeso in PBS 1X. Si procede con una centrifugazione per 15 minuti a 1800 rpm senza freno. La soluzione a gradiente di densità Ficoll-Paque consente di separare le diverse componenti cellulari ematiche, si formeranno più strati così caratterizzati: una parte superiore costituita da plasma e piastrine, un anello di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), uno strato di Ficoll ed infine un pellet costituito da eritrociti e granulociti.

Terminata la centrifuga vengono eliminati gli strati cellulari non di interesse, e il pellet verrà sottoposto a lisi osmotica al fine di eliminare gli eritrociti: il pellet viene risospeso in 7 mL di una soluzione NaCl 0.2% per 30 secondi e poi portata di nuovo a 0.9% NaCl mediante l'aggiunta di 7 mL di una soluzione di NaCl 1.6%, il campione viene poi centrifugato per 5 minuti a 900 rpm. Questo processo viene ripetuto un'ulteriore volta per assicurarsi una lisi completa degli eritrociti. Infine si effettua un lavaggio in PBS 1X e poi i neutrofili vengono risospesi in RPMI completo con 10% FBS, 0.5% kanamicina, 1% di L-glutammina 2mM., 5% aminoacidi non essenziali e 5% sodio piruvato.



**Figura 7.** Rappresentazione schematica del protocollo di isolamento dei neutrofili

Per verificare il corretto esito dell'isolamento i neutrofili vengono colorati con Blu di metilene e osservati al microscopio: i neutrofili si caratterizzano per il loro nucleo polimorfonucleato che li rende facilmente identificabili.



**Figura 8** Neutrofili colorati con Blu di metilene

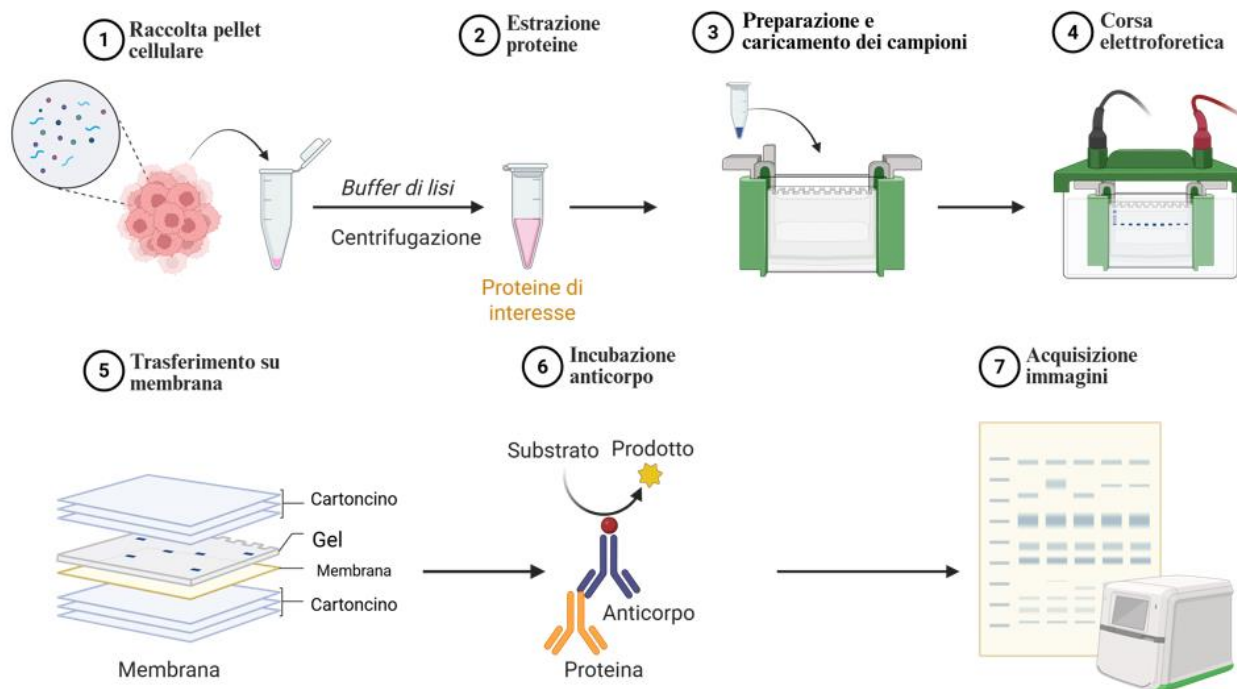
### **3.3 Western Blot**

La tecnica del Western Blot è stata utilizzata per valutare l'espressione di proteine di interesse nei neutrofili. Inizialmente viene effettuata l'estrazione di proteine a partire da pellet cellulare mediante estrazione chimica in RIPA buffer addizionato di inibitori di proteinasi e di fosfatasi.

Successivamente l'estratto proteico è stato quantificato mediante saggio colorimetrico Bradford. I campioni per la corsa elettroforetica sono stati preparati come segue: 20 ug di estratto proteico per campione, Laemmli Buffer 4X contenente  $\beta$ -mercaptoetanololo e portati a volume 20 uL con RIPA buffer. I campioni sono stati poi fatti bollire per consentire la denaturazione proteica ed infine caricati su un gel al 12% ottimale per la risoluzione delle proteine di interesse mediante corsa elettroforetica in base al loro peso molecolare. Segue, tramite elettroblotting, il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa svolto per 2 ore in ghiaccio a 100 V costanti.

Terminato il trasferimento, viene effettuata la colorazione in rosso Ponceau-S per verificare il corretto trasferimento delle proteine. Successivamente la membrana viene bloccata in una soluzione 5% milk in TBS 1X per un'ora a temperatura ambiente in agitazione, per saturare i legami aspecifici.

La membrana è stata poi incubata per tutta la notte con gli anticorpi primari di interesse diluiti in una soluzione al 3% BSA in TBS-T 1X. Il giorno seguente, la membrana viene lavata per 30 minuti in soluzione di lavaggio TBS-T 1X e successivamente incubata a temperatura ambiente per 1 ora con l'anticorpo secondario HRP. Finita l'incubazione, la membrana è stata lavata per 30 minuti in tampone di lavaggio ed infine il segnale è stato sviluppato mediante kit di chemiluminescenza (cod.) mediante esposizione al ChemiDoc. L'intensità del segnale è stata misurata mediante il programma Image Lab (BioRad).



*Figura 9. Rappresentazione schematica protocollo Western Blot*

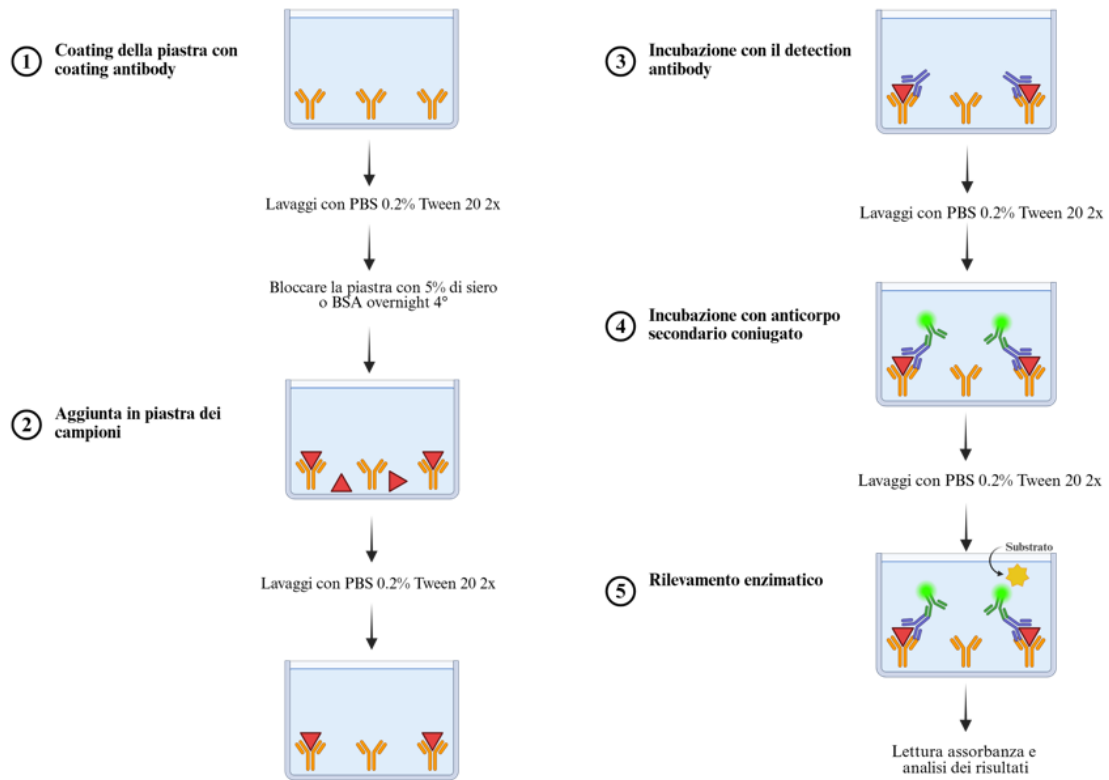
### 3.4 Elisa

Per determinare la concentrazione di citochine e chemochine di interesse nel medium cellulare è stato effettuato il saggio ELISA.

Per questi esperimenti, in particolare, è stato effettuato il saggio immunoenzimatico sandwich quantitativo ELISA. Le piastre sono state preparate inizialmente immobilizzando l'anticorpo monoclonale specifico per il target di interesse lasciando la piastra a 4°C per tutta la notte. Successivamente sono stati effettuati lavaggi per rimuovere l'anticorpo residuo non legato, aggiungendo una soluzione di blocco per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di impedire i legami aspecifici. Terminato il tempo di blocco, sono stati aggiunti i campioni opportunamente diluiti e le soluzioni standard, lasciando in incubazione per 2 ore a temperatura ambiente per consentire il legame con il primo anticorpo immobilizzato. Trascorse le 2 ore vengono prima effettuati dei lavaggi e poi aggiunto un secondo anticorpo biotilato incubato 1 ora a temperatura ambiente. Si termina eseguendo dei lavaggi ed aggiungendo streptavidina e tetrametilbenzidina al fine di consentire lo sviluppo di colore. La reazione viene bloccata mediante soluzione di

acido solforico 2 N dopo 15 minuti. La lettura è stata effettuata allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450 nm.

I medium cellulari utilizzati sono stati conservati a -80°C fino al giorno dell'esperimento.



*Figura 10. Rappresentazione schematica protocollo Sandwich ELISA*

### **3.5 Induzione NET ed immunocitochimica**

I neutrofili sono stati seminati a una densità 200.000 c/w in una piastra a 24 pozzetti contenente copri oggetti precedentemente sterilizzati; al fine di consentire l'adesione dei neutrofili ai vetrini, questi sono stati incubati per 3 ore. Trascorso il tempo di incubazione, è stato rimosso il terreno e sono stati eseguiti due lavaggi in PBS 1X al fine di eliminare le cellule non adese. Per indurre la formazione delle NET è stato aggiunto Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ad una concentrazione finale di 100nM, e le cellule sono state incubate a diverse temperature per valutare come nel tempo avviene il rilascio delle NETs. Finito il tempo di esposizione alla PMA, i vetrini sono stati lavati in PBS 1X e fissati con una soluzione al 4% di paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente. Concluso il fissaggio, i vetrini sono stati lavati per 5 min in PBS 1X ripetuto per 3 volte ed infine conservati a +4°C in camera umida.

### **3.6 Immunocitochimica (ICC)**

Al fine di valutare la formazione delle NETs è stata eseguita una immunocitochimica sui vetrini preparati come riportato precedentemente. I vetrini vengono prima portati a temperatura ambiente e poi vengono eseguiti dei lavaggi in PBS 1X, successivamente si procede con i seguenti step:

- permeabilizzazione in soluzione 0.1% TRITON X-100 per 1 minuto;
- lavaggio in PBS 1X da 3 minuti ripetuto per 5 volte;
- blocco con 3% FBS in soluzione 0.1 % Tween-20 per 1 ora a temperatura ambiente;
- incubazione con anticorpi primari per tutta la notte diluiti in soluzione 1 % FBS contenete 0.1% Tween-20;
- lavaggio con PBS1 x da 3 minuti ripetuto per 5 volte;
- incubazione con anticorpo secondario diluito in soluzione 1 % FBS contenete 0.1% Tween-20 per 1 ora a temperatura ambiente. Da questo passaggio si è sempre lavorato al buio per evitare la fotodecolorazione dell'anticorpo secondario;
- lavaggio con PBS 1X da 3 minuti ripetuto per 5 volte;
- montaggio su vetrini.

I vetrini sono stati poi acquisiti al microscopio epifluorescente.



#### ***4. RISULTATI E DISCUSSIONE***



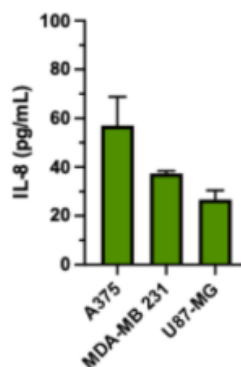
#### **4.1 Valutazione della plasticità funzionale dei neutrofili**

L'obiettivo del mio progetto di tesi è stato quello di indagare il cambiamento fenotipico dei neutrofili verso N1 o N2 in risposta alle linee cellulari tumorali A375, MDA-MB-231 e U87-MG, selezionate per il loro profilo contrastante di reclutamento dei neutrofili.

I TAN possono essere classificati in due fenotipi funzionali: N1, principalmente indotto da interferoni di tipo I (INF), viene definito come antitumorale. Questi rilasciano ROS con un'azione citotossica sulle cellule tumorali e citochine pro-infiammatorie che stimolano la risposta del sistema immunitario contro il tumore

Mentre il fenotipo N2, favorito dall'esposizione del TGF- $\beta$ , viene considerato pro-tumorale mostrando ridotta tossicità per le cellule tumorali e attività immunosoppressive, pro-angiogeniche e metastatiche. I neutrofili N2 rilasciano citochine antinfiammatorie, tra cui TGF- $\beta$  e IL-4, associati al processo di degranulazione che permette il rilascio di mieloperossidasi (MPO), metalloproteasi di matrice-9 (MMP-9), l'arginasi-1 (ARG-1) e l'elastasi neutrofila (NE). (30,32,33)

Dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio mostrano come le tre linee cellulari rilascino diversi livelli di IL-8 nel medium cellulare: le linee A375 e MDA-MB 231 presentano una maggiore concentrazione di IL-8 se comparati con la linea U87-MG.



*Figura 7. Livelli di IL-8 rilasciati dalle differenti linee cellulari prese in esame*

Le metastasi cerebrali da tumori solidi sistemici come carcinoma mammario e melanoma sono tra le più comuni, e mostrano un microambiente immunitario caratterizzato da accumulo di cellule immunitarie, inclusi i neutrofili, in misura superiore rispetto ai tumori cerebrali primitivi come il glioblastoma. Recenti studi indicano che la presenza di neutrofili nelle metastasi cerebrali è modulata da chemochine e segnali tumorali specifici, e varia in funzione dell'origine della metastasi. (53)

In particolare, nel mio progetto di tesi, l'obiettivo è stato quello di caratterizzare il fenotipo dei neutrofili nel modello cellulare sopra descritto.

#### **4.1.1 Polarizzazione dei neutrofili**

Al fine di rispondere agli obiettivi di questo progetto, è stato progettato un setting sperimentale specifico, suddiviso in più giorni, pensato per controllare le variabili rilevanti.

- **Giorno 1:** l'esperimento inizia con la semina cellulare in piastra a 6 pozzetti con le seguenti densità cellulari: 200.000 c/w A375, 500.000 c/w MDA-MB 231 e 500.000 c/w U87-MG. Le piastre vengono incubate overnight a 37° 5% di CO<sub>2</sub> per permettere l'adesione e ottenere una confluenza  $\geq 70\%$ .
- **Giorno 2:** viene controllato il raggiungimento desiderato di confluenza. Viene eliminato il medium di coltura e sostituito con terreno fresco aggiungendo 2.5 mL di terreno per pozzetto.
- **Giorno 3:** si effettua l'isolamento dei neutrofili seguendo il protocollo riportato in materiali e metodi. Viene recuperato il medium cellulare condizionato dalle piastre preparate il giorno 1 e trasferito in una nuova piastra da 6 pozzetti nella quale saranno piastrati 500.000 neutrofili/well. Questo consentirà di condizionare i neutrofili con i fattori rilasciati dalle cellule tumorali. Il rapporto utilizzato di terreno fresco e terreno condizionato utilizzato è stato di 1:1. I neutrofili saranno inoltre piastrati nelle piastre preparate il giorno 1 in modo da avere una co-coltura. Queste due condizioni ci consentono di valutare se i fattori rilasciati dalle cellule tumorali sono in grado di indurre una polarizzazione dei neutrofili oppure se è necessario un contatto cellula-cellula. Per ogni esperimento sono anche stati piastrati neutrofili da utilizzare come controllo negativo (NØ) e neutrofili indotti

N1 ed N2 mediante stimolazione con un cocktail ad hoc come riportato nella tabella 1.

<b>N1 polarization cocktail</b>	<b>N2 polarization cocktail</b>
Lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL	Interleukin-4 (IL-4) 20 ng/mL
Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 50 ng/mL	Tumour growth factor $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 20 ng/mL

**Tabella 1.** Cocktail di polarizzazione per switch fenotipico dei neutrofili verso N1-N2

Le piastre vengono incubate per tutta la notte.

- Giorno 4: vengono raccolti sia i medium cellulari che le cellule, entrambi vengono stoccati a -80 °C fino al loro utilizzo.

I surnatanti sono stati utilizzati per effettuare saggi ELISA mentre i pellet per le analisi Western Blot.

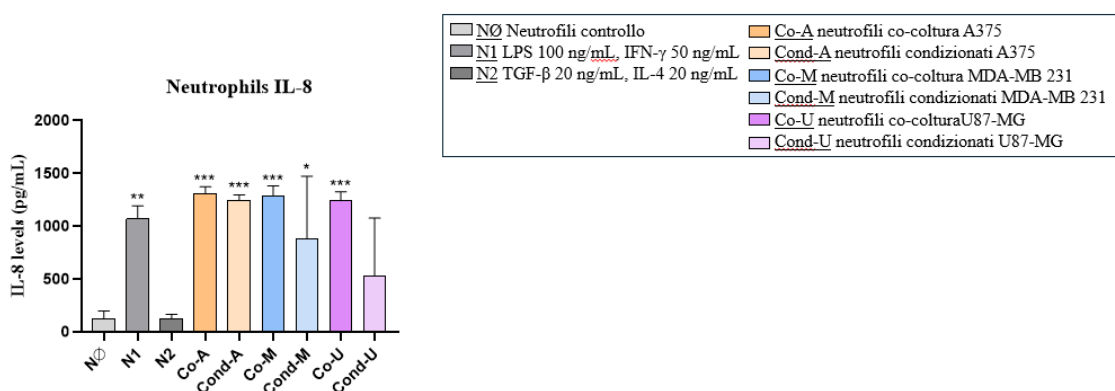
Tutti gli esperimenti svolti sono stati effettuati in triplicato.

## 4.2 Valutazione espressione IL-8 mediante analisi ELISA

L'interluchina-8 (IL-8) è una chemochina pro-infiammatoria, descritta inizialmente per il suo ruolo come potente fattore chemiotattico per il reclutamento dei neutrofili. Nel contesto oncologico, ha assunto un ruolo centrale come mediatore chiave nella progressione tumorale, modulando l'interazione tra cellule neoplastiche, stromali e componenti del sistema immunitario innato promuovendo proliferazione, angiogenesi e migrazione tumorale; tanto che la sua espressione aberrante è associata ai meccanismi di progressione tumorale. In diversi contesti tumorali i livelli aumentati di IL-8 sono stati associati ad una prognosi negativa sostenuta dalla promozione metastatica. (39)

Come mostrato in *Figura 12*, i livelli di IL-8 nel medium colturale, misurati mediante il test ELISA, sono risultati variabili.

In particolare, i neutrofili N1 hanno rilasciato IL-8 a concentrazioni più elevate rispetto ai neutrofili N2. Questo dato contrasta con quanto riportato in letteratura come ad esempio, nello studio di *Ohms et al.* dove hanno osservato un rilascio maggiore di IL-8 nei neutrofili polarizzati N2 rispetto agli N1. (52)



**Figura 12.** Livelli di IL-8 rilasciati dai neutrofili condizionati e in co-cultura

Una possibile spiegazione è che il cocktail di polarizzazione utilizzato nel nostro modello potrebbe non essere stato sufficiente a generare un fenotipo N2 pienamente funzionale, limitando così il rilascio di IL-8.

I livelli di IL-8 sono elevati anche nelle tre co-culture di neutrofili-cellule tumorali, rispettivamente A375, MDA-MB-231 e U87-MG, la cui espressione è probabilmente sostenuta dall'interazione diretta tra neutrofili e cellule tumorali, capaci di incentivare il

rilascio di IL-8 determinando il reclutamento dei neutrofili all'interno del sito tumorale creando le condizioni per un microambiente infiammatorio cronico che potrebbe sostenere la polarizzazione degli stessi verso un fenotipo N2. È interessante osservare come il rilascio di IL-8 sia risultato minore per i neutrofili condizionati con il medium della linea MDA-MB 231 e U87-MG. Una prima ipotesi potrebbe essere la presenza di una popolazione mista N1 e N2 oppure per la più debole polarizzazione mediata dai fattori rilasciati dalle cellule tumorali e dall'assenza del contatto cellula-cellula. Ulteriori esperimenti saranno necessari per verificare queste ipotesi.

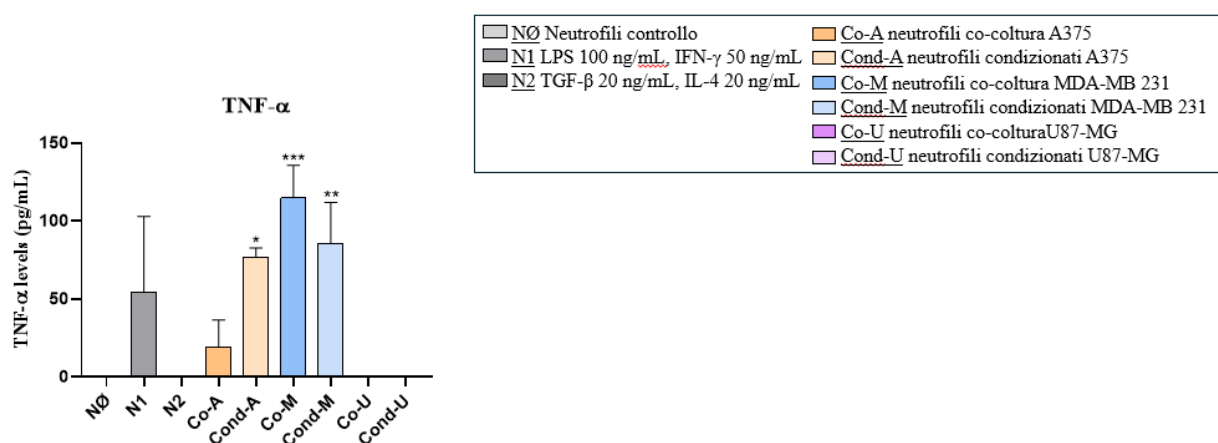
In accordo con i dati sperimentali ottenuti, la letteratura evidenzia come le cellule di melanoma (A375) in co-coltura con i neutrofili inducano un incremento della produzione di IL-8 attraverso l'attivazione di NF- $\kappa$ b (40). Parallelamente i livelli sierici elevati della chemochina d'interesse correlano con uno stadio avanzato del tumore, spesso associato alla presenza di metastasi, soprattutto per quanto riguarda il carcinoma mammario duttale, suggerendo un ruolo chiave di IL-8 nella progressione tumorale. (41)

Un elevato rilascio è visibile anche nella coltura condizionata con le A375, tanto da essere comparabile alla co-coltura, in questo caso, basandosi sulla letteratura è stato confermato che i fattori solubili rilasciati dalle cellule di melanoma sostengono il continuo rilascio di IL-8, anche nei sistemi condizionati senza contatto diretto con le tumorali. (40)

### 4.3 Valutazione espressione TNF- $\alpha$ mediante analisi ELISA

Il TNF- $\alpha$  è una citochina pro-infiammatoria coinvolta in processi patologici come l'infiammazione cronica, l'autoimmunità, la crescita e la progressione tumorale. La produzione di TNF- $\alpha$  è associata ai neutrofili N1 confermando la loro attività di soppressione tumorale nelle prime fasi di crescita: l'elevato aumento di TNF- $\alpha$  crea un ambiente infiammatorio cronico che sostiene la crescita e la proliferazione tumorale, inoltre, promuove il processo metastatico. (42,43)

I valori di TNF- $\alpha$  sono stati valutati mediante test ELISA, e riportati in *Figura 13*. In accordo con la letteratura e lo studio di *Ohms et al.* si conferma l'elevato rilascio dai neutrofili N1, appare invece assente nei neutrofili N0 (fisiologici) e in quelli N2 (pro-tumorali) noti per il rilascio di citochine anti-infiammatorie. (52)



**Figura 13.** Livelli di TNF- $\alpha$  rilasciati dai neutrofili condizionati e in co-coltura

È possibile notare che i livelli di TNF- $\alpha$  variano a seconda della linea tumorale utilizzata con cui sono in contatto.

È interessante vedere come la coltura condizionata delle A375 presenti livelli elevati della citochina rispetto alla co-coltura. Uno studio in letteratura ha dimostrato come i fattori solubili rilasciati dalle cellule tumorali di melanoma aumentino la sopravvivenza dei neutrofili grazie alla produzione costitutiva di GM-CSF, determinando anche il continuo rilascio di TNF- $\alpha$ . (44)

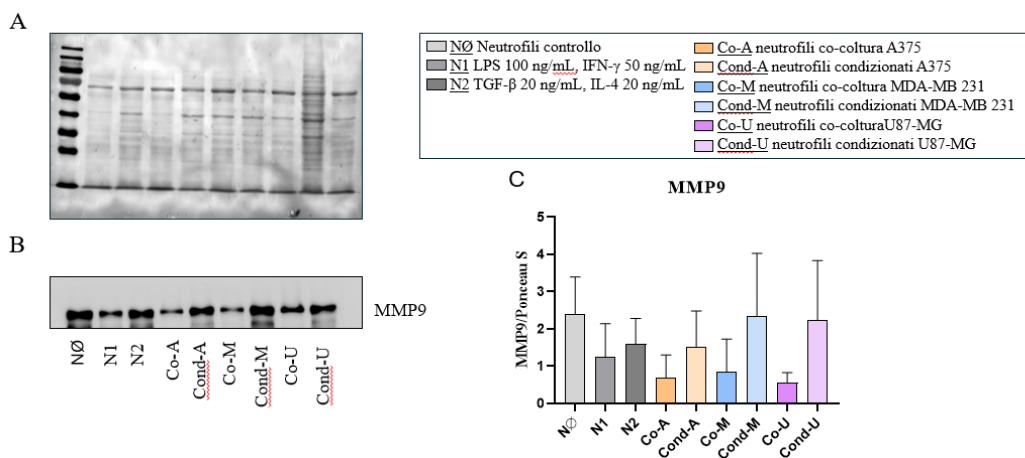
Questo dato ha una tendenza opposta per la linea tumorale MDA-MB-231 dove si osserva come l'espressione sia elevata soprattutto nelle co-culture, e in leggera decrescenza per le colture condizionate. Come riportato in letteratura, e dallo studio di *Balkwill*, la presenza di elevati livelli di TNF- $\alpha$  in pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico, correlano con la progressione e la sopravvivenza dello stesso, attraverso l'attivazione di NF- $\kappa$ b nelle cellule tumorali iniziali, tanto da permettere alle stesse di produrre ulteriori livelli di citochina. (42)

Non si osservano livelli di TNF- $\alpha$  in entrambe le condizioni sperimentali per la linea U-87-MG, questo andrebbe a confermare la sua attività fortemente immunosoppressiva, attraverso la produzione di TGF- $\beta$  e IL-10, tanto da interferire con la risposta immunitaria antitumorale svolta dai neutrofili N1. (45)

#### 4.4 Valutazione espressione MMP-9 mediante analisi Western Blot

L'MMP-9 è una proteina costitutivamente espressa nei granuli neutrofilici, ed è coinvolta nella degradazione delle proteine di matrice extracellulare. La sua secrezione è fondamentale nei processi patologici e fisiologici inclusi il rimodellamento tissutale, il *wound healing* e il cancro. (25)

Nel nostro sistema sperimentale, i livelli di MMP-9 sono stati identificati mediante analisi Western Blot, e riportati in *Figura 14*, l'intensità delle bande sono state calcolate normalizzando i valori rispetto al totale proteico caricato e misurato mediante colorazione con S-Ponceau.



**Figura 14.** Livelli di espressione di MMP-9 in neutrofilii condizionati e in co-coltura.  
Pannello A: rosso S-Poceau. Pannello B: espressione MMP9. Pannello C: quantifica intensità delle bande

I risultati ottenuti mostrano che la sua espressione, nei neutrofilii, è modulata dalle differenti condizioni sperimentali utilizzate. In particolare, la riduzione di MMP-9 nei neutrofilii N1 e il suo aumento nei neutrofilii N2 sono coerenti con il ruolo pro-tumorale della proteina, coinvolta nel rimodellamento della matrice extra-cellulare, contribuendo al rilascio di fattori pro-angiogenici, come il VEGF, favorendo la formazione di nuovi vasi e creando un ambiente favorevole alla crescita tumorale. (46)

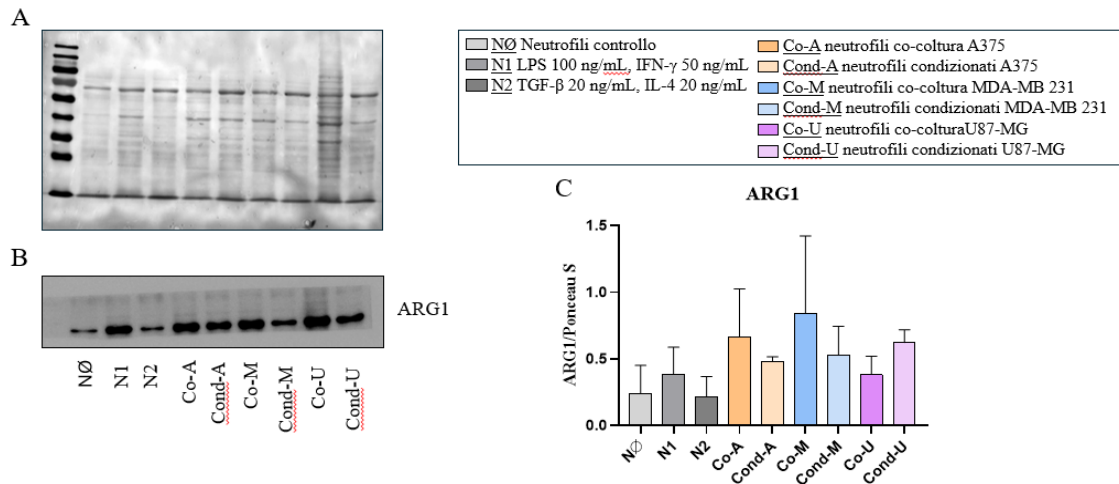
Inoltre, la produzione di MMP-9 è considerata una caratteristica distintiva dei TANs con fenotipo N2, differentemente per i TANs N1 che presentano una ridotta espressione della stessa. (33)

Un ulteriore dato emerso è che le colture condizionate derivate dalle diverse linee tumorali presentano livelli di MMP-9 più elevati rispetto alle co-culture dirette. Questo potrebbe suggerire che i fattori solubili rilasciati dalle cellule tumorali, come TGF- $\beta$ , IL-8, GM-CSF e G-CSF, sono in grado di promuovere la polarizzazione dei neutrofilii verso un fenotipo pro-tumorale stimolando la secrezione di MMP-9.

Questi risultati supportano l'ipotesi che i neutrofilii una volta esposti a segnali tumorali acquisiscano un profilo pro-tumorale caratterizzato da una elevata espressione di MMP-9, rafforzando il cross-talk attivo tra sistema immunitario e tumore. (31)

#### 4.5 Valutazione espressione ARG-1 mediante analisi Western Blot

L'analisi dei livelli di ARG-1 è stata svolta come per MMP-9 mediante Western Blot e riportato in *Figura 15*.



**Figura 15.** Livelli di espressione di ARG-1 in neutrofili condizionati e in co-coltura. Pannello A: rosso S-Poceau. Pannello B: espressione ARG1. Pannello C: quantifica intensità delle bande

Si evidenzia una differente modulazione dell'espressione di questo enzima nelle diverse condizioni sperimentali utilizzate: i neutrofili polarizzati N1 presentano una concentrazione maggiore di ARG-1 se paragonati con gli N2, questo potrebbe essere dovuto al rilascio di ARG-1 nel medium di coltura. ARG-1 rilasciata nel microambiente tumorale causa una deplezione di L-arginina e la conseguente inibizione dell'attivazione dei linfociti T. (35)

In contatto diretto o condizionato, i neutrofili mostrano un aumento dell'espressione di ARG-1 in tutte le linee esaminate. In particolare, le co-culture con la linea A375 e MDA-MB 231 mostrano una concentrazione maggiore di ARG-1 se confrontate con le stesse linee condizionate. Questo andamento è opposto per la linea di glioblastoma U87-MG. Questi dati suggeriscono che le cellule tumorali rilascino nel microambiente fattori che promuovono un incremento dell'ARG-1. Per avere una maggiore chiarezza sullo stato di polarizzazione dei neutrofili è però necessario effettuare un saggio ELISA per determinare la concentrazione nel medium cellulare.

#### **4.6 Visualizzazione del rilascio di NETs post induzione con PMA**

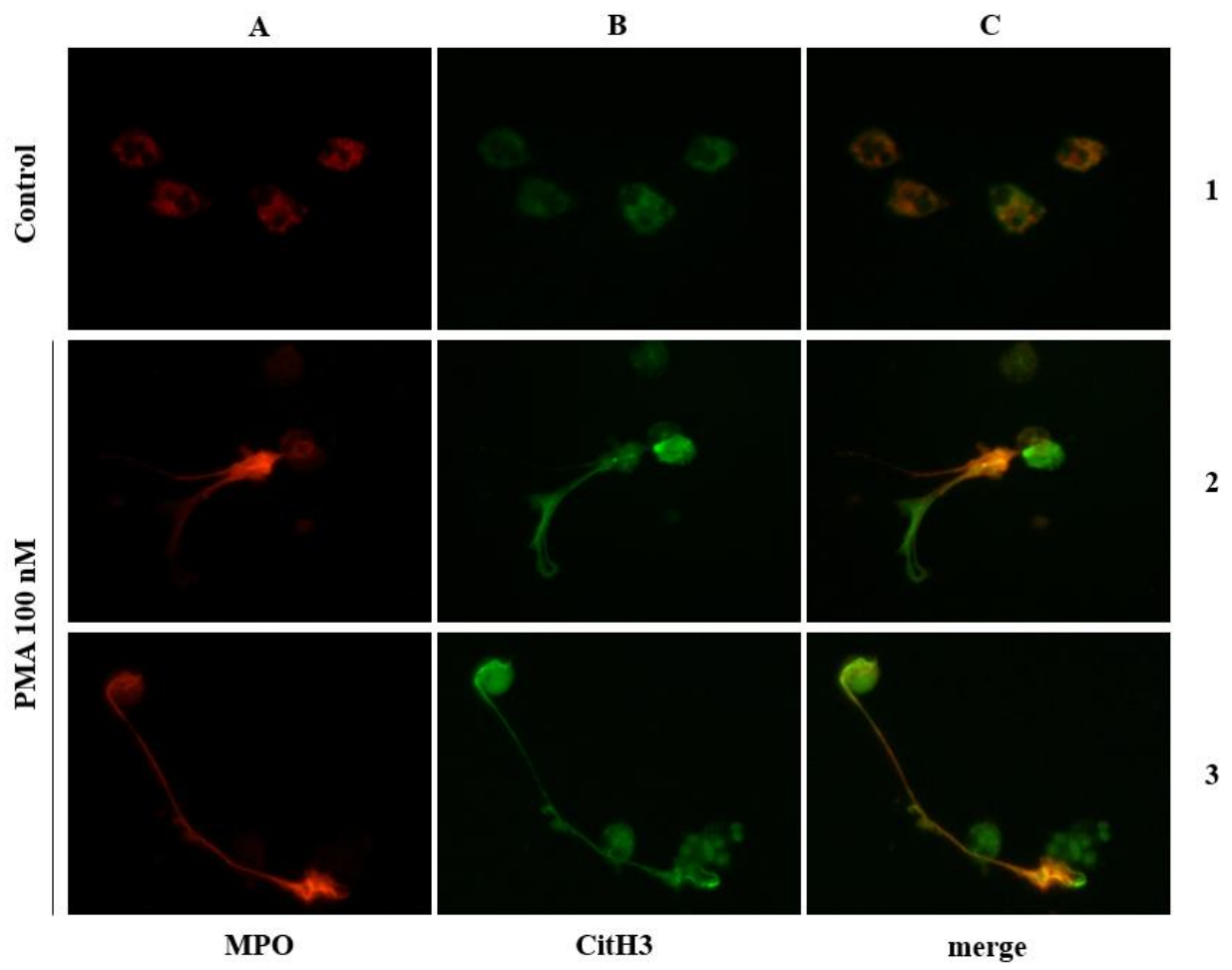
Le NETosi sono composte da cromatina de-condensata associata alla presenza di proteine granulari come le MPO, NE e l'istone citrullinato H3 (CitH3).

Dal punto di vista fisiologico la NETosi, processo mediante il quale vengono rilasciate le NETs, contribuisce alla difesa dell'ospite contro i patogeni potenziando la funzione pro-infiammatoria. Tuttavia, una formazione eccessiva o disregolata di NET è stata osservata in diverse condizioni patologiche, incluso il cancro. (49)

Mentre i neutrofilici N1, generalmente, non vanno incontro a NETosi, i neutrofilici polarizzati N2 sfruttano questo meccanismo per promuovere la metastatizzazione, sopprimendo l'immunità antitumorale e sostenendo la crescita del tumore. (50)

Al fine di studiare questo meccanismo nel nostro modello, il nostro primo obiettivo è stato quello di settare un protocollo di immunocitochimica che consenta la visualizzazione delle NETs indotte dal trattamento con PMA.

Le immagini riportate in *Figura 16* sono state acquisite al microscopio a fluorescenza, la colonna A riporta l'enzima MPO visualizzato in rosso, la colonna B il CitH3 visualizzato in verde e la colonna 3 mostra la sovrapposizione delle due immagini. La prima riga riporta i neutrofilici non stimolati con PMA, si può osservare come l'espressione di MPO e CitH3 sia confinata al citoplasma. La riga 2 e 3, invece, riporta i neutrofilici stimolati con 100 nM PMA, i dati ottenuti sono concordi quanto riportato in letteratura: i neutrofilici in seguito alla stimolazione si attivano e alterano la loro morfologia, comportando il rilascio delle NET che emergeranno dalla cellula quando la membrana citoplasmatica viene rotta. (51)



*Figura 18. Acquisizione NETs al microscopio fluorescente*



## ***5. CONCLUSIONI***



In conclusione, il mio lavoro di tesi ha confermato la notevole plasticità funzionale dei neutrofili in co-coltura o condizionati con i fattori rilasciati nel microambiente tumorale delle diverse linee cellulari prese in esame.

L'incremento di mediatori come IL-8 e TNF- $\alpha$  in contesti di co-coltura e condizionamento con melanoma e carcinoma mammario suggerisce la creazione di un microambiente infiammatorio che può sostenere la progressione tumorale. Al contrario, la linea di glioblastoma U87-MG ha mostrato un profilo prevalentemente immunosoppressivo. L'aumento dell'espressione di MMP-9 e di ARG-1 nei neutrofili esposti ai segnali tumorali, supportano l'ipotesi di una polarizzazione verso un fenotipo pro-tumorale (N2), capace di favorire il rimodellamento della matrice extracellulare e l'evasione immunitaria. Complessivamente, i risultati ottenuti nel mio progetto di tesi sottolineano l'importanza del cross-talk tra tumore e sistema immunitario innato, dove i neutrofili emergono come una popolazione dinamica.

Successivi esperimenti saranno necessari per definire il fenotipo dei neutrofili nei modelli presi in esame. Sarà inoltre necessario aumentare il numero di replicati biologici al fine di ottenere una maggiore significatività statistica.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- 1) Abbas, A. K. (2021). *Cellular and molecular immunology*.
- 2) Pieren, D. K. J., Boer, M. C., & De Wit, J. (2022). The adaptive immune system in early life: The shift makes it count. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1031924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031924>
- 3) Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- 4) Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- 5) Hibino, S., Kawazoe, T., Kasahara, H., Itoh, S., Ishimoto, T., Sakata-Yanagimoto, M., & Taniguchi, K. (2021). Inflammation-Induced tumorigenesis and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5421. <https://doi.org/10.3390/ijms22115421>
- 6) De Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, *41*(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- 7) Liubomirski, Y., Lerrer, S., Meshel, T., Rubinstein-Achiasaf, L., Morein, D., Wiemann, S., Körner, C., & Ben-Baruch, A. (2019). Tumor-Stroma-Inflammation networks promote pro-metastatic chemokines and aggressiveness characteristics in Triple-Negative breast cancer. *Frontiers in Immunology*, *10*, 757. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00757>
- 8) Ahmad, A., Banerjee, S., Wang, Z., Kong, D., Majumdar, A., & Sarkar, F. (2009). Aging and inflammation: etiological culprits of cancer. *Current Aging Science*, *2*(3), 174–186. <https://doi.org/10.2174/1874609810902030174>
- 9) Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- 10) Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

- 11) Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004a). The three es of Cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- 12) Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- 13) Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- 14) Zhang, M., Qin, H., Wu, Y., & Gao, Q. (2024). Complex role of neutrophils in the tumor microenvironment: an avenue for novel immunotherapies. *Cancer Biology and Medicine*, 21(10), 1–15. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0192>
- 15) Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Le basi dell'immunologia. Fisiopatologia del sistema immunitario*.
- 16) Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- 17) Carnevale, S., Ghasemi, S., Rigatelli, A., & Jaillon, S. (2020). The complexity of neutrophils in health and disease: Focus on cancer. *Seminars in Immunology*, 48, 101409. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101409>
- 18) Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R., & Quinn, M. T. (2022). Microbes and the fate of neutrophils. *Immunological Reviews*, 314(1), 210–228. <https://doi.org/10.1111/imr.13163>
- 19) Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- 20) Yvan-Charvet, L., & Ng, L. G. (2019). Granulopoiesis and neutrophil homeostasis: a metabolic, daily balancing act. *Trends in Immunology*, 40(7), 598–612. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.004>
- 21) Saladin, K. S. (2017). *Anatomia umana*.

- 22) SenGupta, S., Hein, L. E., & Parent, C. A. (2021). The recruitment of neutrophils to the tumor microenvironment is regulated by multiple mediators. *Frontiers in Immunology*, *12*, 734188. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734188>
- 23) Kim, J., & Bae, J. (2016). Tumor-Associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators of Inflammation*, *2016*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6058147>
- 24) Loh, W., & Vermeren, S. (2022). Anti-Inflammatory neutrophil functions in the resolution of inflammation and tissue repair. *Cells*, *11*(24), 4076. <https://doi.org/10.3390/cells11244076>
- 25) Blanter, M., Gouwy, M., & Struyf, S. (2021). Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 14*, 141–162. <https://doi.org/10.2147/jir.s284941>
- 26) El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J., Gougerot-Pocidallo, M., & Dang, P. M. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, *273*(1), 180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>
- 27) Jaillon, S., Galdiero, M. R., Del Prete, D., Cassatella, M. A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology*, *35*(4), 377–394. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0374-8>
- 28) Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*, *459*, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.029>
- 29) Que, H., Fu, Q., Lan, T., Tian, X., & Wei, X. (2022). Tumor-associated neutrophils and neutrophil-targeted cancer therapies. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1877*(5), 188762. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188762>
- 30) Wang, Z., Hu, H., Bao, Y., Pang, L., & Yang, C. (2025). Neutrophils in cancer: from immune defense to tumor promotion. *Cancer Biology and Medicine*, *22*(6), 1–20. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2025.0023>
- 31) Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: two sides of the same coin. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2015/983698>

- 32) Zhou, Y., Shen, G., Zhou, X., & Li, J. (2025). Therapeutic potential of tumor-associated neutrophils: dual role and phenotypic plasticity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 178. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02242-7>
- 33) Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- 34) Raftopoulou, S., Valadez-Cosmes, P., Mihalic, Z. N., Schicho, R., & Kargl, J. (2022). Tumor-Mediated Neutrophil Polarization and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3218. <https://doi.org/10.3390/ijms23063218>
- 35) Furumaya, C., Martinez-Sanz, P., Bouti, P., Kuijpers, T. W., & Matlung, H. L. (2020). Plasticity in pro- and anti-tumor activity of neutrophils: Shifting the balance. *Frontiers in Immunology*, 11, 2100. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02100>
- 36) Eruslanov, E. B., Bhojnarwala, P. S., Quatromoni, J. G., Stephen, T. L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W. W., Conejo-Garcia, J. R., Feldman, M., Albelda, S. M., & Singhal, S. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5466–5480. <https://doi.org/10.1172/jci77053>
- 37) Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., & Jorcyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: Potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896–8904. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1734>
- 38) Kaltenmeier, C., Simmons, R. L., Tohme, S., & Yazdani, H. O. (2021). Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer metastasis. *Cancers*, 13(23), 6131. <https://doi.org/10.3390/cancers13236131>
- 39) Sherry, C., Dadgar, N., Liu, Z., Fan, Y., Xiao, K., Zaidi, A. H., Donnenberg, V. S., Donnenberg, A. D., Bartlett, D. L., & Wagner, P. L. (2025). The Interleukin-8-CXCR1/2 Axis as a Therapeutic Target in Peritoneal Carcinomatosis. *Current Oncology*, 32(9), 496. <https://doi.org/10.3390/curroncol32090496>

- 40) Peng, H., Liang, S., Henderson, A. J., & Dong, C. (2006). Regulation of interleukin-8 expression in melanoma-stimulated neutrophil inflammatory response. *Experimental Cell Research*, 313(3), 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.10.030>
- 41) Ma, Y., Ren, Y., Dai, Z., Wu, C., Ji, Y., & Xu, J. (2017). IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(3), 421–426. <https://doi.org/10.17219/acem/62120>
- 42) Balkwill, F. (2006). TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), 409–416. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9005-3>
- 43) Wang, X., Qiu, L., Li, Z., Wang, X., & Yi, H. (2018). Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 2456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02456>
- 44) Modestino, L., Cristinziano, L., Trocchia, M., Ventrici, A., Capone, M., Madonna, G., Loffredo, S., Ferrara, A. L., Romanelli, M., Simeone, E., Varricchi, G., Rossi, F. W., De Paulis, A., Marone, G., Ascierio, P. A., & Galdiero, M. R. (2023). Melanoma-derived soluble mediators modulate neutrophil biological properties and the release of neutrophil extracellular traps. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 72(10), 3363–3376. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03493-5>
- 45) Weller, M., Roth, P., Preusser, M., Wick, W., Reardon, D. A., Platten, M., & Sampson, J. H. (2017). Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nature Reviews Neurology*, 13(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.64>
- 46) Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., & Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737–744. <https://doi.org/10.1038/35036374>
- 47) Galdiero, M. R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218(11), 1402–1410. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003>
- 48) Hambardzumyan, D., & Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in Cancer*, 1(4), 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.009>
- 49) Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., & Ferri, L. (2013). Neutrophil extracellular traps sequester

- circulating tumor cells and promote metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3446–3458. <https://doi.org/10.1172/jci67484>
- 50) Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(10), 601–620. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0222-4>
- 51) Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- 52) Ohms, M., Möller, S., & Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00532>
- 53) Lin, Y., Wei, K., Chen, P., Lim, M., & Hwang, T. (2021). Roles of neutrophils in glioma and brain metastases. *Frontiers in Immunology*, 12, 701383. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.701383>

## ***7. RINGRAZIAMENTI***