

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

***RUOLO DEI NEUTROFILI NEL TUMORE: STUDIO IN VITRO IN
MODELLO UMANO DI ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO***

Relatore

Prof.ssa Silvia Fallarini



Firmato digitalmente da Silvia Fallarini
Data: 28.02.2026 14:57:47 CET
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Correlatore

Dott.ssa Gaia Lesca

Candidato

Romina Quaglia

Anno Accademico 2024-2025

Sessione Straordinaria

Lista delle abbreviazioni

α -SMA: α -actina del muscolo liscio

5-FU: 5-floruracile

APC: cellule presentanti l'antigene

BRPC: cancro pancreatico resecabile borderline

CAF: fibroblasti associati al cancro

cDC1: cellule dendritiche convenzionali di tipo 1

CTL: linfociti T citotossici

CTLA-4: proteina-4 associata ai linfociti T citotossici

DAMP: profili molecolari associati al danno

DC: cellule dendritiche

ECM: matrice extracellulare densa

EGF: Fattore di crescita epidermica

EMT: transizione epiteliale-mesenchimale

F-PNET: tumori neuroendocrini pancreatici funzionali

FDA. Food and Drug Administration

FGF2: fattore di crescita dei fibroblasti-2

G-CSF: dal fattore stimolante le colonie di granulociti

GM-CSF: fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi

GMP: progenitori granulociti-monociti

HGF: fattore di crescita degli epatociti

IFN-I: interferone di tipo I

IgM: Immunoglobuline M

IL-6: interleuchina-6

ILC: cellule linfoide innate

IPMN: neoplasie mucinose papillari intraduttali

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LAPC: cancro pancreatico non resecabile localmente avanzato

LT-HSC: cellule staminali ematopoietiche a lungo termine

MCN: neoplasie mucinose cistiche

MDSC: cellule soppressorie di derivazione mieloide

MHC-I: complesso maggiore di istocompatibilità di classe I

MMP: metalloproteasi della matrice

MPO: mieloperossidasi

NETs: Neutrophil extracellular traps

NF- κ B: fattore nucleare kappa delle cellule B attivate

NF-PNET: tumori neuroendocrini pancreatici non funzionali

NK: cellule natural killer

PACC: carcinoma a cellule acinari pancreatiche

PAMP: profili molecolari associati ai patogeni

PanIN: neoplasie intraepiteliali pancreatiche

PC: carcinoma pancreatico

PD-L1: ligando di morte programmata-1

PDAC: adenocarcinoma duttale pancreatico

PDGF: fattore di crescita derivato dalle piastrine

PNET: tumori neuroendocrini pancreatici

PSC: cellule stellate pancreatiche

ROS: specie reattive dell'ossigeno

SI: Sistema immunitario

STAT3: trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3

TAA: antigeni associati al tumore

TAM: Macrofagi associati al tumore

TAN: neutrofili associati al tumore

TGF- β 1: fattore di crescita trasformante beta-1

TME: microambiente tumorali

TNF: fattore di necrosi tumorale

Tregs: linfociti T regolatori

TSA: antigeni specifici del tumore

VEGF: fattore di crescita endoteliale vascolare

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	TUMORE AL PANCREAS	2
1.1.1	Epidemiologia e fattori di rischio.....	2
1.1.2	I tumori pancreatici e le loro caratteristiche.....	3
1.1.3	Tumori caldi e tumori freddi	5
1.1.4	Trattamento del PDAC.....	8
1.1.5	Immunoterapia	10
1.2	IL SISTEMA IMMUNITARIO.....	11
1.2.1	Immunità innata	12
1.2.2	Immunità adattativa.....	13
1.3	TUMORI ED IMMUNITÀ.....	15
1.3.1	Infiammazione cronica e tumorigenesi	17
1.4	NEUTROFILI: BIOLOGIA E RUOLO NEL PDAC	19
1.4.1	Granulopoiesi e reclutamento nel tessuto tumorale	20
1.4.2	Funzioni effettrici dei neutrofili nel tessuto tumorale.....	21
1.4.3	Polarizzazione e plasticità dei neutrofili nel PDAC.....	22
2	SCOPO DEL LAVORO	26
3	MATERIALI E METODI	28
3.1	Colture cellulari.....	29
3.2	Isolamento dei neutrofili	29
3.3	Western Blot.....	31
3.4	ELISA	32
3.5	Induzione delle NETs	34
3.6	Immunocitochimica (ICC)	34
4	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	36
4.1	Valutazione del rilascio di IL-8 mediante saggio ELISA	37
4.2	Valutazione dello switch funzionale neutrofilico	38

4.3	Polarizzazione dei neutrofili	38
4.4	Valutazione espressione di ARG-1 mediante analisi Western Blot.....	39
4.5	Valutazione espressione di MMP-9 mediante analisi Western Blot.....	42
4.6	Rilascio di NETs	44
5	CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI	48
6	BIBLIOGRAFIA.....	50

1 Introduzione

1.1 TUMORE AL PANCREAS

Il pancreas è un organo ghiandolare retroperitoneale con funzione esocrina ed endocrina. La funzione esocrina è fondamentale per la digestione mediante secrezione di enzimi quali amilasi, lipasi e proteasi; invece, la componente endocrina regola il metabolismo rilasciando insulina e glucagone. Data la sua importanza vitale, danni patologici possono portare a gravi conseguenze. In questo contesto, il carcinoma pancreatico (PC), risulta essere una delle neoplasie più severe, con il tasso di mortalità globale più elevato. (1)

Il PC può essere classificato come: tumore neuroendocrino (NET) del pancreas, che rappresenta una neoplasia rara costituendo meno dello 0.5% di tutti i tumori maligni pancreatici, e tumore del pancreas esocrino. Tra i vari sottotipi, l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) risulta essere il più diffuso e aggressivo. (2)

A rendere complessa la diagnosi della patologia sono i fattori di rischio molto diversificati e l'assenza di biomarcatori specifici. Per questo, quando la patologia viene diagnosticata molte volte è già in uno stadio avanzato, spesso non resecabile e, nei casi peggiori, non più responsiva ad alcuna terapia farmacologica. (1)

1.1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

Ad oggi il PC si colloca al settimo posto come causa di morte correlata al cancro e, secondo il *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), diventerà la seconda causa di morte associata al cancro, negli Stati Uniti, entro il 2030. (3) I tassi di incidenza più elevati si registrano in Europa, Nord America, Australia e Nuova Zelanda. (4)

Oltre il 90% dei casi di tumore pancreatico è rappresentato dal PDAC, neoplasia spesso diagnosticata in stadio avanzato, quando le possibilità di trattamento chirurgico risultano essere limitate o assenti. A questo sottotipo di tumore si associa il tasso di mortalità più elevato che dopo 5 anni dalla diagnosi è solamente del 12%. (2)

In Italia, nel 2022 i decessi attribuiti a questa neoplasia sono stati circa 14.900 mentre nel 2024 sono state stimate circa 13.585 nuove diagnosi di tumore al pancreas, con una distribuzione sostanzialmente equivalente tra uomini e donne. La sopravvivenza netta a cinque anni dalla diagnosi è solamente del 12%. (5)

Un aspetto particolarmente preoccupante riguarda le fasce di età più giovani, tra i 15 e i 39 anni, poiché dati recenti evidenziano un aumento delle diagnosi, soprattutto nella popolazione femminile. (4)

Lo sviluppo di tumore al pancreas dipende da fattori di rischio classificati come non modificabili tra cui: età, sesso, etnia, diabete mellito, storia familiare, e fattori di rischio modificabili che includono fumo, consumo di alcol, fattori dietetici, pancreatite, obesità, infezioni e stato socioeconomico. (6)

1.1.2 I tumori pancreatici e le loro caratteristiche

Il pancreas può essere interessato da tumori esocrini o da NET che differiscono principalmente per l'origine cellulare, la prognosi e il trattamento.

I tumori esocrini rappresentano circa il 90% dei tumori che colpiscono il pancreas, sono i tumori più aggressivi, spesso diagnosticati in stadio avanzato. Derivano dalle cellule duttali e dalle cellule acinari del pancreas. (7)

Tra i tumori esocrini, il PDAC è quello più comune e aggressivo, può originare da lesioni precancerose del tessuto pancreatico tra cui:

- neoplasie intraepiteliali pancreatiche (PanIN): sono lesioni microscopiche localizzate a livello dei dotti pancreatici, difficilmente individuabili con tecniche di imaging convenzionali. Le PanIN si dividono in PanIN di basso grado e PanIN di alto grado. Differenti studi dimostrano che LG-PanIN sono frequenti anche in soggetti sani mentre le HG-PanIN sono più rare e associate alla presenza di PDAC invasivo. Circa 85% dei PDAC deriva da questa neoplasia precancerosa; inoltre, la mutazione del gene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) è riscontrabile nella quasi totalità delle PanIN, rappresentando un evento precoce nella carcinogenesi pancreaticca;
- neoplasie mucinose papillari intraduttali (IPMN): sono neoplasie epiteliali di dimensioni superiori ad 1 cm, spesso rilevate mediante metodiche radiologiche. Le IPMN a livello del dotto pancreatico principale presentano il maggior rischio di progressione neoplastica; tuttavia, nel complesso, il rischio di trasformazione maligna rimane relativamente basso; (8)
- neoplasie mucinose cistiche (MCN): sono neoplasie macroscopiche epiteliali non invasive, localizzate prevalentemente nella coda del pancreas e più comuni nelle

donne. Vengono facilmente riconosciute ma lo sviluppo e la progressione neoplastica risultano difficilmente prevedibili.

Numerosi studi suggeriscono che l'identificazione di queste lesioni precursori rappresenti uno strumento fondamentale per la diagnosi precoce del PC, soprattutto in soggetti con familiarità. (9)

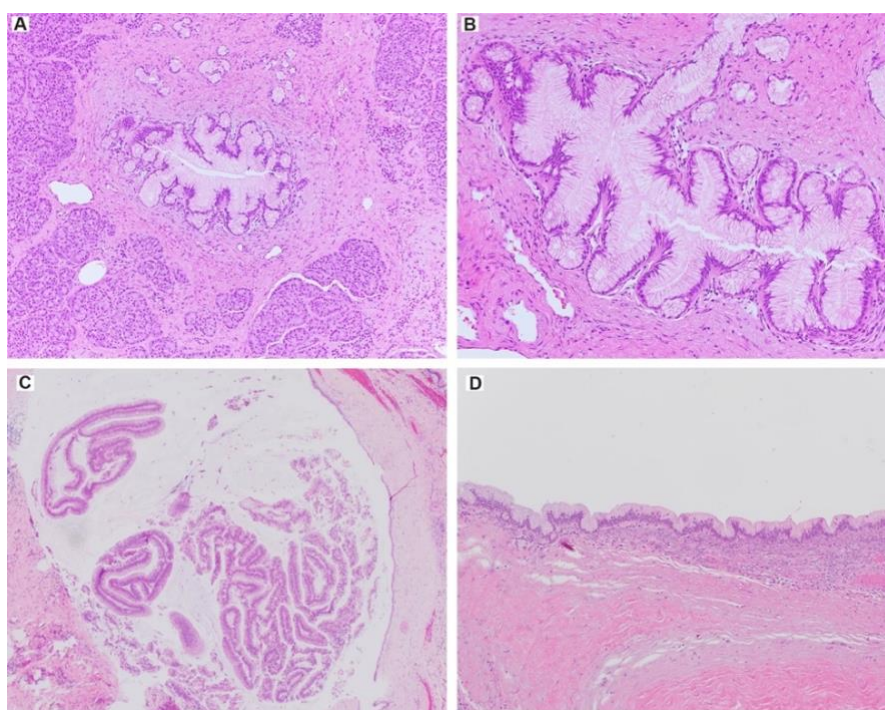


Figura 1 Lesioni precancerose del tessuto pancreatico. **A-B** Neoplasia intraepiteliale pancreatica di basso grado, **C** neoplasia mucinosa papillare intraduttale, **D** neoplasia mucinosa cistica

Altri tumori esocrini, meno comuni, sono caratterizzati in base alle posizioni istopatologiche e alle loro caratteristiche.

Il carcinoma a cellule acinari pancreatiche (PACC), è una forma molto rara di cancro al pancreas che porta, in un numero elevato di pazienti, ad ipersecrezione di lipasi; caratteristica che aiuta a differenziarlo ad altri tipi di neoplasie. Il PACC, rispetto al PDAC, ha prognosi più favorevole e la resezione chirurgica sia nei pazienti senza metastasi che con metastasi è correlata ad un aumento del tasso di sopravvivenza. (10)

Il pancreatoblastoma, derivante sempre da cellule esocrine epiteliali, è un raro tumore pancreatico spesso diagnosticato nei bambini di età inferiore ai 10 anni, la diagnosi negli

adulti invece è molto più sporadica. È una neoplasia spesso diagnostica in stadio avanzato; ad oggi, il trattamento migliore è la resezione con prognosi di solito favorevole. (11)

I tumori neuroendocrini pancreatici (PNET) sono invece un tipo di neoplasia che colpisce più raramente l'organo, derivano dalle cellule secernenti ormoni e si possono suddividere in due categorie: funzionali (F-PNET) e non funzionali (NF-PNET).

Gli F-PNET sono così definiti in quanto vanno a modificare la secrezione di ormoni pancreatici biologicamente attivi responsabili di specifiche sindromi cliniche. Le forme più frequentemente diagnosticate sono l'insulinoma e il gastrinoma. L'insulinoma determina un'eccessiva produzione di insulina con conseguente ipoglicemia, mentre il gastrinoma, attraverso la secrezione di gastrina induce un'eccessiva produzione di acido gastrico responsabile di diarrea, ulcera peptica e malattia da reflusso gastro-esofageo.

Gli NF-PNET sono spesso localizzati nella testa del pancreas e non determinano modifiche significative nella secrezione ormonale. Questa tipologia di tumore non è associata ad una sintomatologia specifica, infatti, la diagnosi spesso è accidentale o legata alla presenza della massa tumorale primaria e delle metastasi che determinano un effetto compressivo o un'alterazione funzionale del pancreas o di altri organi colpiti. La resezione chirurgica rimane l'approccio migliore per il trattamento dei PNET. (12)

1.1.3 Tumori caldi e tumori freddi

Il PDAC presenta un'elevata eterogeneità intratumorale e intertumorale, questo contribuisce a rendere la malattia così complessa e costituisce uno dei principali ostacoli ai progressi terapeutici. (13) La risposta clinica al PDAC rimane infatti ampiamente insoddisfacente ed uno dei fattori che contribuisce a questo fallimento è la desmoplasia distintiva del microambiente tumorale (TME) caratterizzata da una matrice extracellulare densa (ECM) e dai fibroblasti associati al cancro (CAF). I CAF sono costituenti essenziali del TME, le cellule tumorali secernono molteplici fattori, tra cui fattore di crescita trasformante beta-1 (TGF- β 1), il fattore di crescita dei fibroblasti-2 (FGF2), *Sonic Hedgehog* e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) che stimolano ed attivano i CAF. Questi a loro volta promuovono la metastatizzazione del PDAC e l'ambiente immunosoppressivo. (14)

Lo stroma fibrotico denso e gli elementi che lo compongono creano una barriera fisica attorno al core del tumore, arrivando ad occupare anche 80% del volume totale della neoplasia. Questa struttura protettiva limita significativamente la penetrazione dei

trattamenti terapeutici, rendendo chemioterapia, radioterapia e immunoterapia spesso poco efficaci. L'organizzazione dello stroma è cruciale per il tumore, le cellule stellate pancreatiche (PSC) insieme alle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), i CAF e i macrofagi associati al tumore (TAM) sono le cellule numericamente più presenti nel tumore. L'aumento dei linfociti T regolatori (Tregs), richiamati da elevati livelli di interleuchina-6 (IL-6), sopprime l'azione delle cellule immunitarie ed inoltre anche monociti, neutrofili, mastociti e cellule NK, non sono in grado di svolgere correttamente la loro funzione.

Il processo desmoplastico è supportato da una produzione eccessiva di elementi stromali. In particolare, le PSC producono laminina, fibronectina, acido ialuronico e collagene, quest'ultimo rende complesso l'ingresso di linfociti T effettori all'interno del tumore. Inoltre, l'elevata densità stromale determina un microambiente ipovascolare e la conseguente ipossia induce cambiamenti genetici nelle cellule tumorali favorendone l'adattamento al TME. (15) Per le ragioni sopra elencate, lo studio approfondito del TME è fondamentale per comprendere i meccanismi di crescita e progressione tumorale e per riuscire a valutare l'evoluzione della malattia.

Inizialmente, il PDAC era stato classificato come tumore immunologicamente “freddo”, in quanto non veniva osservata un'elevata infiltrazione di cellule immunitarie. Tuttavia, evidenze più recenti hanno dimostrato che la tradizionale distinzione tra tumore “caldo” e “freddo” non può essere pienamente applicata al PDAC. Infatti, all'interno del TME pancreatico è possibile riconoscere la coesistenza di aree che presentano caratteristiche tipiche di entrambi i fenotipi tumorali. (13)

I tumori “freddi” sono caratterizzati da una bassa densità di linfociti T CD8⁺. Le cellule T sono confinate in aree periferiche della massa tumorale; infatti, la presenza di barriere fisiche, ne limita la penetrazione all'interno del nucleo tumorale. La vascolarizzazione è irregolare e le cellule endoteliali formano strati disorganizzati creando un ambiente ipossico e acido che inibisce le funzioni delle cellule linfocitarie. Inoltre, i tumori freddi sono caratterizzati da elevati livelli di citochine antinfiammatorie quali IL-10 e TGF- β e l'infiltrato cellulare si compone principalmente di macrofagi, Tregs, MDSC e CAF.

I tumori immunologicamente “caldi”, detti anche immunoinfiammatori, sono caratterizzati da alti livelli di linfociti T CD8⁺ che rilasciano IFN- γ per migliorare la presentazione dell'antigene, cellule NK con attività citotossica e cellule dendritiche (DC) che producono

chemochine come CXCL9 e CXCL10 e sono essenziali per il reclutamento delle cellule T all'interno del tumore.

Nei tumori freddi, le cellule del sistema immunitario (SI) sono quasi del tutto o completamente assenti nel tumore, inoltre l'immunosoppressione dovuta al rilascio di citochine antinfiammatorie favoriscono la crescita e lo sviluppo tumorale, contrariamente a ciò che accade per i tumori caldi dove l'infiltrato immunitario, in presenza di stimoli proinfiammatori, è in grado di attivarsi e quindi di originare una risposta antitumorale. Questo TME infiammatorio, caratterizzato da un elevato carico mutazionale, favorisce invece l'attività antitumorale. (13;16;17)

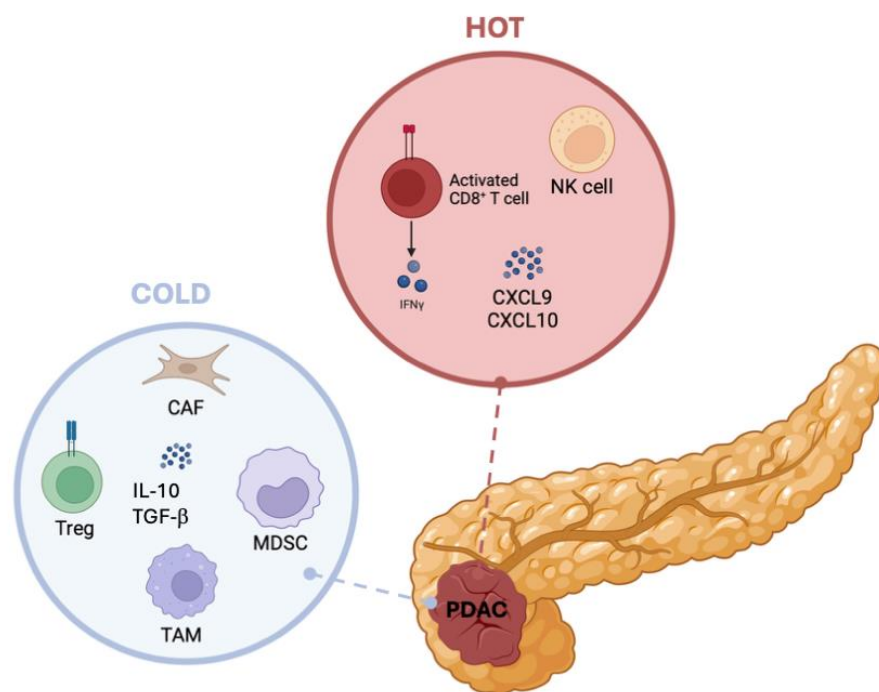


Figura 2 Rappresentazione di zona calda e zona fredda nell'adenocarcinoma duttale pancreatico

Nei tumori freddi la capacità di eludere il SI è strettamente legata all'abilità del TME di ostacolare la presentazione dell'antigene. In particolare, le cellule tumorali alterano il corretto funzionamento del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I) sulle cellule presentanti l'antigene (APC), interferendo in questo modo con il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T citotossici (CTL).

Il funzionamento del MHC-I viene compromesso attraverso tre meccanismi:

- alterazioni genetiche: mutazioni a carico di geni che codificano per elementi strutturali come le catene pesanti o beta-2-microglobulina impediscono l'assemblaggio corretto del MHC-I;
- alterazioni epigenetiche: modifiche istoniche repressive mediate dal *Polycomb Repressive Complex 2* e dall'ipermetilazione del DNA, determinano il silenziamento trascrizionale dei geni e la perdita di espressione di MHC-I;
- alterazioni post-traduzionali: MCH-I viene prodotto ma sequestrato e distrutto, sfruttando il sistema di autofagia, prima che possa raggiungere la membrana cellulare.

All'interno del TME un altro ruolo fondamentale è svolto dalle cellule dendritiche convenzionali di tipo 1 (cDC1) che processano e presentano l'antigene alle CTL. Il reclutamento delle cDC1 dipende da specifiche chemochine, quali CCL5 e XCL1. La loro azione è però compromessa dal rilascio di fattori immunosoppressivi, come TGF- β e lattato, da parte delle cellule tumorali, limitando il gradiente di richiamo dei cDC1 verso il tumore. Inoltre, anche quando le DC sono presenti all'interno del tumore, la loro maturazione e funzione risultano compromesse dalla ridotta produzione di interferone di tipo I (IFN-I). (17) Diverse strategie terapeutiche sono state adottate nel tentativo di superare questa resistenza intrinseca dovuta al TME. In particolare, approcci mirati alla degradazione dell'acido ialuronico, all'inibizione dei fattori immunosoppressivi o di vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione stromale hanno mostrato risultati clinici variabili. Sebbene i benefici clinici siano ancora limitati, questi studi supportano il concetto che la combinazione di terapie che hanno come target lo stroma e immunoterapie possa rappresentare una strategia promettente per convertire il PDAC da tumore "freddo" a tumore immunologicamente "caldo". (18)

1.1.4 Trattamento del PDAC

La terapia del PC, ed in particolare del PDAC, è molto complessa e richiede spesso un approccio terapeutico multimodale. Il coinvolgimento dei vasi sanguigni all'interno del tumore è un parametro fondamentale per la pianificazione del trattamento; sulla base di questo criterio i tumori vengono classificati in: cancro pancreatico resecabile quando il coinvolgimento vascolare è praticamente assente, cancro pancreatico resecabile borderline

(BRPC) quando il coinvolgimento di arterie e vasi è moderato e cancro pancreatico non resecabile localmente avanzato (LAPC) quando il tumore ha invaso arterie e vene fondamentali. (19)

Ad oggi, la resezione chirurgica è l'unica opzione considerata curativa, tuttavia, solo al 10% dei pazienti viene diagnosticato il PC ai primi stadi e quindi ancora operabile. (20)

Il trattamento standard prevede, dopo la resezione, una cura adiuvante con chemioterapici ma studi recenti suggeriscono che, l'inversione di questa sequenza, quindi l'approccio iniziale di chemioterapia possa migliorare la sopravvivenza globale. (21)

La chirurgia con intento radicale risulta invece difficile da realizzare in caso di BRPC e LAPC. L'intervento chirurgico, in caso di cancro metastatico, ad oggi non è considerato un'opzione terapeutica accettata per assenza di evidenze cliniche solide. (19)

La chemioterapia è una componente essenziale del trattamento del PC e può migliorare significativamente la sopravvivenza dei pazienti. Il 5-floruracile (5-FU) è stato per molto tempo l'unico farmaco disponibile, poi, nel 1997, la gemcitabina è diventata il farmaco di prima linea.

Attualmente la chemioterapia adiuvante prevede generalmente la somministrazione, per circa 6 mesi, di un regime chemioterapia combinato quale il mFOLFIRINOX, che include 5-FU, leucovorina modificata, irinotecan e l'oxaliplatino. (19)

Nei pazienti con cancro metastatico è stato consolidato l'impiego combinato di gemcitabina e nab-paclitaxel, una formulazione di paclitaxel legato all'albumina, è uno standard terapeutico di prima linea. (22)

Un ulteriore e rilevante progresso terapeutico è stato ottenuto con la formulazione liposomiale di irinotecan. In particolare, il regime NALIRIFOX, in cui irinotecan di mFOLFIRINOX è sostituito con la formula liposomiale, ha dimostrato beneficio in termini di sopravvivenza nei pazienti con PC localmente avanzato o metastatico.

L'irinotecan liposomiale ha ottenuto l'approvazione da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) nel 2024.

Infine, sia FOLFIRINOX sia gemcitabina/nab-paclitaxel, sono opzioni appropriate nella chemioterapia di induzione per LAPC. (19)

Uno studio pubblicato a dicembre 2025, condotto dal gruppo del Prof. Barbacid, descrive una terapia combinata testata in modelli preclinici di PDAC. La somministrazione concomitante di un inibitore di RAS(ON) attivo verso diverse isoforme di KRAS

(daraxonrasib), di un inibitore irreversibile della famiglia EGFR/HER2 (afatinib) e del PROTAC SD35 diretto verso STAT3 ha indotto una regressione tumorale completa nei modelli murini. Inoltre, non sono state osservate recidive per oltre 200 giorni dalla conclusione del trattamento e non sono stati osservati effetti collaterali significativi. (23)

1.1.5 Immunoterapia

L'immunoterapia è una strategia terapeutica consolidata in diverse tipologie di tumori liquidi tuttavia anche nel PDAC, come in altri tumori solidi, è stata usato questo approccio ma i risultati ottenuti fino ad ora non sono clinicamente soddisfacenti. Oltre al TME immunosoppressivo, anche le mutazioni a carico del gene KRAS influenzano in maniera considerevole la risposta al trattamento.

Nel corso degli anni gli inibitori del checkpoint immunitario, efficaci in altre neoplasie, tra cui gli anticorpi diretti verso ligando di morte porgrammata-1 (PD-L1) e verso la proteina-4 associata ai linfociti T citotossici (CTLA-4) sono stati valutati in diversi studi clinici, sia in monoterapia che in combinazione con altri trattamenti, senza però dimostrare i benefici clinici attesi nel PDAC.

Le attuali strategie di immunoterapia che si stanno testando sono orientate alla modulazione del TME. Un primo target è rappresentato dalle MDSC, si mira a ridurre l'accumulo agendo sull'asse chemochina-recettore ma i risultati clinici ottenuti finora sono contrastanti.

Un'altra strategia promettente riguarda il ripristino delle funzionalità delle DC mediante l'utilizzo di anticorpi agonisti del recettore CD40. Studi clinici preliminari hanno dimostrato che l'attivazione di CD40, in combinazione con chemioterapia o radioterapia, può potenziare la risposta immunitaria antitumorale.

I TAM sono un'ulteriore componente chiave del TME immunosoppressivo del PDAC. In particolare, il blocco del checkpoint fagocitico CD47-SIRP α è un targetin promettente poiché l'espressione di CD47 sulle cellule tumorali inibisce la fagocitosi mediata dai macrofagi. Attualmente è in corso uno studio clinico di fase 1/2 per valutare l'efficacia di un anticorpo diretto verso questo asse.

Infine, il rimodellamento dello stroma è un altro approccio terapeutico rilevante. Il blocco del recettore CXCR4 ha mostrato risultati incoraggianti in studi clinici recenti. I CAF nel TME secernono elevate quantità di CXCL12 che si accumula nella periferia dello stroma tumorale intrappolando i linfociti T CXCR4⁺ e limitandone l'infiltrazione nel tumore. La

combinazione di antagonisti CXCR4 con anti-PD-1 e chemioterapici ha mostrato risultati clinici incoraggianti rendendo questa terapia una delle più promettenti nel trattamento immunoterapico del PDAC. (24)

Strategie emergenti nell'immunoterapia mettono al primo posto i vaccini. GVAX, un vaccino a cellule tumorali intere, induce la formazione di aggregati linfoidi terziari intratumorali, suggerendo la conversione del PDAC da tumore freddo a tumore immunogenico. Uno studio sperimentale ha inoltre combinato GVAX con urelumab (anti-CD137) e nivolumab (anti-PD-1) e quest'associazione ha determinato un aumento delle cellule T CD8⁺ intratumorali. Inoltre, come detto precedentemente, le mutazioni del gene KRAS sono presenti nella maggior parte dei PDAC. La vaccinazione contro KRAS mutante rappresenta un approccio promettente; i vaccini di nuova generazione, come ELI-002, hanno la capacità di indurre risposte immunitarie specifiche e rappresentano una terapia particolarmente interessante, sebbene ancora in fase di sviluppo. (19)

1.2 IL SISTEMA IMMUNITARIO

Il SI è un insieme integrato di cellule, tessuti, organi che cooperano per riconoscere ed eliminare sostanze estranee ed agenti patogeni, che possono causare danno al nostro organismo, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi generale.

Il SI si attiva principalmente in risposta a batteri, virus, funghi e parassiti; tuttavia, anche sostanze di natura non infettiva o derivanti da cellule danneggiate del nostro stesso organismo possono portare all'attivazione della nostra rete di difesa.

Per svolgere efficacemente le sue funzioni, il SI si articola in due componenti strettamente interconnesse: l'immunità innata e l'immunità adattativa.

L'immunità innata è la prima linea di difesa che si attiva in risposta ai patogeni mentre l'immunità adattativa si attiva più tardivamente ed è specifica per il tipo di infezione. È essenziale conoscere il ruolo e i meccanismi alla base del funzionamento di queste due braccia del SI; comprendere le connessioni tra immunità innata e immunità adattativa è indispensabile per il progresso della ricerca scientifica e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. (25)

1.2.1 Immunità innata

L'immunità innata è la prima linea di difesa che si attiva quando l'organismo entra in contatto con patogeni invasori. Essa comprende tre componenti principali che lavorano in sinergia: barriere fisiche e chimiche, cellule specializzate e proteine ematiche.

Le barriere epiteliali rappresentano una superficie fisica che separa l'organismo dall'ambiente esterno. La cute e le mucose dei tratti gastrointestinale, respiratorio e genitourinario impediscono l'ingresso dei microrganismi patogeni; per questo motivo, la loro integrità è essenziale per la funzione di difesa. L'efficacia delle barriere epiteliali è ulteriormente potenziata dalla produzione di alcuni peptidi antimicrobici, come defensine e catelicidine, e dalla presenza dei linfociti T intraepiteliali, che costituiscono una linea di difesa immediata contro i microrganismi.

Il superamento delle barriere epiteliali da parte dei microrganismi determina l'attivazione della componente cellulare dell'immunità innata, fondamentale per il contenimento iniziale dell'infezione e per l'attivazione delle risposte immunitarie successive.

Le diverse popolazioni cellulari hanno specifiche funzioni. Macrofagi e neutrofili hanno il compito di fagocitare i microrganismi. Le DC svolgono un ruolo essenziale nella comunicazione con l'immunità adattativa. Le cellule linfoidi innate (ILC) rilasciano IFN- γ e differenti tipi di interleuchine. Tra le componenti cellulari più importanti vi sono le cellule natural killer (NK), in grado di distinguere le cellule sane da quelle infette e attivare così la loro potente attività citotossica. Infine, i mastociti sono cellule sentinella che attivate, in risposta a prodotti microbici, rilasciano mediatori lipidici e citochine proinfiammatorie.

Le molecole effettrici solubili invece rappresentano la terza componente, o branca umorale, dell'immunità innata. Tra queste rientrano gli anticorpi naturali, il sistema del complemento, le collectine, le pentrassine e le ficoline. Il sistema del complemento è un elemento chiave dell'immunità innata ed è costituito da numerose proteine plasmatiche che cooperano per favorire l'opsonizzazione del patogeno, il reclutamento dei fagociti e, in alcuni casi, l'uccisione diretta del patogeno.

Il SI innato contrasta le infezioni attraverso meccanismi di riconoscimento aspecifici, basati sull'identificazione di strutture molecolari generiche condivise da diverse classi di microrganismi, note come profili molecolari associati ai patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP). L'attivazione della risposta innata può inoltre essere indotta dal

rilascio di molecole endogene da parte di cellule danneggiate o morte, definite profili molecolari associati al danno (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP).

Per controllare le infezioni l'immunità innata attiva un processo infiammatorio e blocca la replicazione virale. Il processo infiammatorio è essenziale per il controllo dell'infezione, poiché consente la fagocitosi e l'eliminazione dei microrganismi patogeni che hanno colonizzato i tessuti dopo aver superato le barriere fisiche e le mucose. Nel sito di infezione, le cellule sentinella, si attivano in seguito al riconoscimento di PAMP e DAMP e producono citochine proinfiammatorie. Le principali sono: il fattore di necrosi tumorale (TNF), IL-1 e IL-6. TNF e IL-1 hanno un ruolo essenziale nelle reazioni infiammatorie di fase acuta e promuovono inoltre il rilascio di IL-6 da parte di diverse tipologie di cellule; questa citochina è coinvolta nelle risposte infiammatorie locali e sistemiche.

Citochine e chemochine favoriscono il reclutamento dei leucociti circolanti nel sito di infezione. In particolare, neutrofili e macrofagi svolgono funzioni effettrici fondamentali, tra cui la fagocitosi e la distruzione all'interno dei fagolisosomi dei microrganismi patogeni.

Nel complesso, l'infiammazione mediata dall'immunità innata consente un efficace controllo dell'infezione e contribuisce ai processi di riparazione del tessuto danneggiato.

La seconda risposta mediata dall'immunità innata è il blocco della replicazione virale, un meccanismo difensivo che si basa essenzialmente sull'azione degli IFN di tipo I. Tra questi, i più importanti coinvolti nella fase difensiva sono l'IFN- α e l'IFN- β , prodotti dalle cellule infettate. Questi IFN conferiscono alle cellule sane resistenza dall'infezione virale e rendono le cellule infettate maggiormente sensibili agli stimoli proapoptotici mediati dal TNF. In questo modo la propagazione del virus viene limitata.

Le cellule dell'immunità innata e i fattori da esse prodotti sono fondamentali per l'attivazione dell'immunità adattativa. (25)

1.2.2 Immunità adattativa

L'immunità adattativa, definita anche specifica o acquisita, aumenta la capacità difensiva del nostro organismo in risposta ad un agente infettivo. La risposta che ne consegue è di natura sistemica, data la capacità dei linfociti, principali cellule effettrici di quest'immunità, di attivarsi nel tessuto bersaglio e poi migrare verso distretti anatomici più distanti. I linfociti T e i linfociti B, attraverso specifici recettori di membrana, riconoscono gli epitopi antigenici e vanno in contro ad un'attivazione altamente specifica.

Gli antigeni vengono “presentati” ai linfociti dalle APC, le più specializzate sono del DC. Il riconoscimento dell’antigene da parte dei linfociti naïve negli organi linfoidi determina la loro proliferazione e differenziazione in cellule effettrici, deputate all’eliminazione del microrganismo, e in cellule della memoria, fondamentali per garantire una risposta rapida ed efficace in caso di successiva esposizione allo stesso antigene. Questo processo richiede alcuni giorni e si conclude con la morte per apoptosi delle cellule effettrici, consentendo il ripristino delle condizioni fisiologiche.

Sulla base delle loro funzioni effettrici, i linfociti contribuiscono alle due principali modalità di risposta dell’immunità adattativa: l’immunità umorale e l’immunità cellulare.

In particolare, l’immunità umorale è mediata dai linfociti B che, in seguito al riconoscimento dell’antigene, differenziano in plasmacellule cioè cellule specializzate nel rilascio di anticorpi. Esistono differenti classi di anticorpi come le immunoglobuline (Ig)M, IgG, IgA e IgE che svolgono funzioni differenti. Gli anticorpi bloccano l’insorgere dell’infezione legandosi al microbo in modo che il complesso venga così riconosciuto dai fagociti e mediante anche l’attivazione del complemento.

I linfociti T invece sono le cellule dell’immunità cellulare, riconoscono esclusivamente antigeni di natura peptidica presentati dal MHC espresso sulla superficie delle cellule dell’ospite.

I linfociti T funzionali si dividono in linfociti T helper e CTL. I primi sono in grado di attivare, mediante rilascio di citochine e molecole di adesione, altre cellule immunitarie specializzate nell’uccisione dei microrganismi. I CTL invece uccidono direttamente le cellule infettate.

La risposta immunitaria dev’essere regolata anche negativamente, per questo l’organismo attiva popolazioni specifiche di Tregs, in modo da inibire una risposta immunitaria eccessiva che potrebbe causare danno ai tessuti e agli organi colpiti. (25)

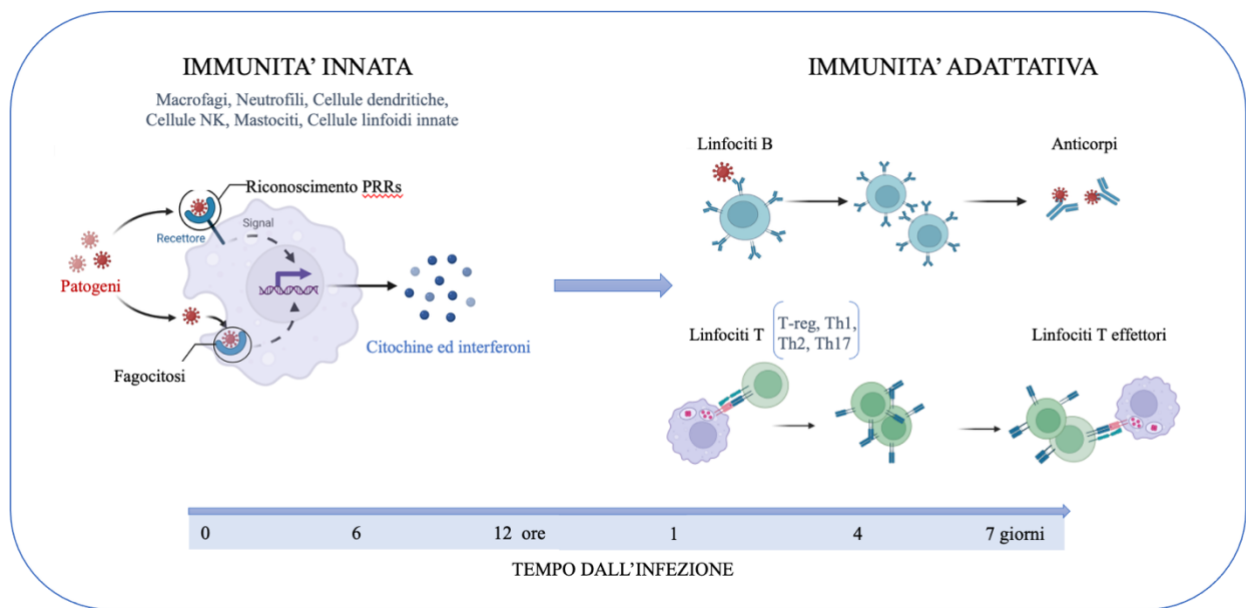


Figura 3 Immunità innata e adattativa. Rappresentazione delle risposte innate e adattative in seguito alla presenza di un patogeno

1.3 TUMORI ED IMMUNITÀ

Il cancro rappresenta una delle problematiche sanitarie di maggiore rilevanza a livello globale, infatti, è una delle principali cause di morbidità e mortalità sia negli adulti che nella popolazione più giovane. Il SI è in grado di riconoscere ed eliminare cellule trasformate prima che queste diano origine ad un tumore maligno, attraverso un processo noto come immunosorveglianza. Tuttavia, le cellule tumorali sono in grado di eludere il rilevamento immunitario compromettendo questa capacità e di conseguenza promuovendo la tolleranza tumorale alla base della crescita e metastatizzazione del tumore. Il sistema di immunosorveglianza quindi non risulta essere sempre efficiente e alcune cellule tumorali possono sfuggire al suo controllo. (26)

Le componenti del SI innato e adattativo sono in grado di attivarsi in seguito al riconoscimento, sulle cellule tumorali, di specifici antigeni che possono essere distinti in: antigeni associati al tumore (TAA) e antigeni specifici del tumore (TSA). I TAA sono proteine self sovraesprese nelle cellule tumorali mentre i TSA derivano da mutazioni genetiche delle cellule neoplastiche. (27)

I TAA, i TSA e le molecole rilasciate in seguito a stress cellulare contribuiscono all'attivazione di cellule NK, DC, linfociti T CD8⁺ citotossici e cellule T CD4⁺ che attraverso meccanismi altamente specifiche cooperano all'eliminazione delle cellule maligne. (26)

L'equilibrio tra l'attività antitumorale del SI e la capacità delle cellule neoplastiche di sfuggire a questo controllo è alla base del concetto di immunoediting tumorale.

L'immunoediting del cancro comprende tre fasi: eliminazione, equilibrio ed evasione.

Nella fase di eliminazione, il SI riconosce ed elimina le cellule tumorali, tuttavia, alcune possono sopravvivere e acquisire resistenza al controllo di "sorveglianza" determinando il passaggio alla fase di equilibrio. In questa fase la crescita tumorale è contenuta ma non completamente soppressa. Alcune cellule acquisiscono ulteriori meccanismi di elusione immunitaria, entrando nella fase di evasione, durante la quale il controllo immunitario viene completamente perso. Le cellule tumorali iniziano a proliferare creando un TME immunosoppressivo, le stesse cellule immunitarie vengono reclutate per sostenere la crescita della neoplasia e la malattia si manifesta clinicamente. (28)

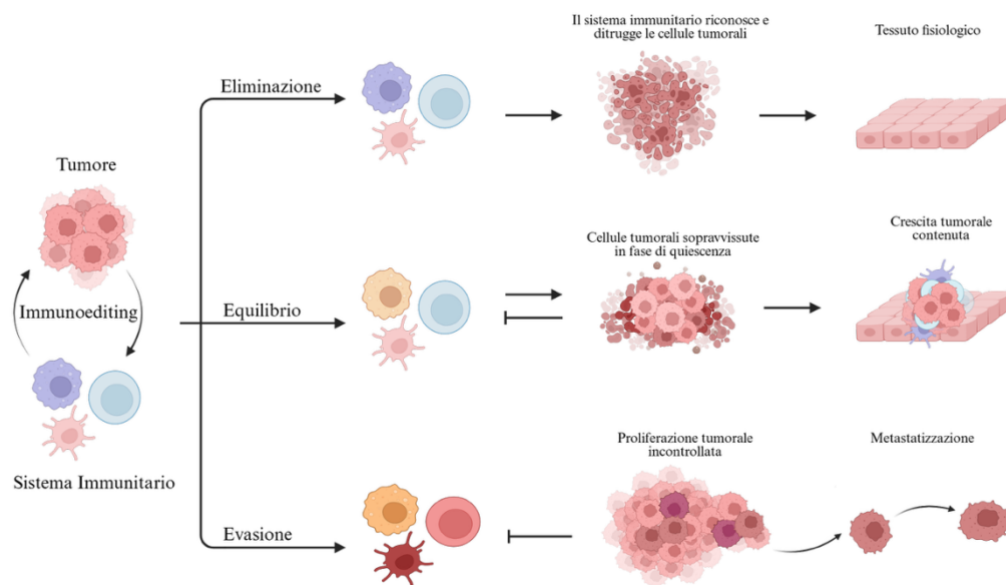


Figura 4 Le tre fasi del processo di immunoediting: eliminazione, equilibrio, evasione

La crescita incontrollata delle cellule tumorali è sostenuta dal TME e dalla ridotta efficacia dell'immunità antitumorale mediata principalmente dai linfociti T. Il cross talk metabolico

tra le cellule tumorali e le cellule immunitarie è alla base dell'evasione immunitaria e della soppressione delle risposte protettive messe in atto dall'organismo. (29)

Il TME è altamente eterogeneo e dinamico, caratterizzato da ipossia, alterazioni metaboliche, elevati livelli di acido lattico ed elementi immunosoppressivi. Le componenti cellulari subiscono una riprogrammazione metabolica che ha un impatto importante sulle loro funzioni effettrici.

Una delle alterazioni metaboliche con rilevanza maggiore riguarda la glicolisi. Le cellule tumorali, per proliferare rapidamente, hanno bisogno di elevate quantità di glucosio e mostrano pertanto una sovraespressione di enzimi glicolitici. L'iperglicolisi induce nelle cellule tumorali un'up-regolazione di PD-L1, attivazione di vie di segnalazione pro-tumorali come il fattore nucleare kappa delle cellule B attivate (NF- κ B) e mutazioni del gene oncosoppressore p53. L'attività delle cellule immunitarie antitumorali risulta fortemente compromessa dalla competizione metabolica nel TME. In particolare, la carenza di glucosio promuove la differenziazione dei linfociti T in Tregs immunosoppressivi, inoltre le funzioni di queste cellule sono potenziate dalle elevate concentrazioni di acido lattico derivante anche dalla vascolarizzazione irregolare nel tumore.

Il microambiente acido ostacola anche la presentazione dell'antigene da parte delle DC e induce la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2. L'attività delle cellule NK risulta inibita dall'iperglicolisi tumorale ed inoltre il pH acido induce l'apoptosi di queste cellule attraverso il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'inibizione della produzione di INF- γ .

Le cellule tumorali mostrano anche un'attivazione marcata del metabolismo lipidico con elevata sintesi di acidi grassi. In membrana l'espressione dei trasportatori lipidici è upregolata e tra questi CD36 è correlato ad una prognosi negativa in differenti tipi di tumori. Inoltre, l'accumulo di colesterolo e lipidi ossidati contribuisce alla protezione delle cellule tumorali dall'immunosorveglianza e alla riduzione degli effetti antitumorali. (30)

1.3.1 Infiammazione cronica e tumorigenesi

L'infiammazione cronica è un fattore chiave nello sviluppo, nella progressione e nel mantenimento del tumore. Circa il 20% dei casi di cancro derivano da un'infiammazione del tessuto stesso o dell'organo colpito. Sebbene la risposta infiammatoria che si attiva in seguito al riconoscimento di un patogeno sia un processo fisiologico la sua cronicizzazione aumenta

il rischio di sviluppo neoplastico. Oltre all'inflammatione che precede il tumore è possibile distinguere un secondo tipo di inflammatione associata alla neoplasia già formata che serve per creare un TME immunosoppressivo che ne sostenga lo sviluppo. (31)

L'inflammatione favorisce anche l'accumulo di numerose alterazioni genetiche nelle cellule neoplastiche importanti per conferire maggiore resistenza e sopravvivenza rispetto alle cellule sane. (32)

L'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico determina una riorganizzazione profonda del TME. Le cellule tumorali riprogrammano le cellule non cancerogene, rimodellano la vascolarizzazione e la ECM attraverso una comunicazione mediata da integrine, caderine, selectine ed immunoglobuline. (33)

In questo contesto, tra le prime cellule ad essere reclutate, ci sono i CAF che rispondono ai mediatori pro-infiammatori rilasciati dalle cellule tumorali ed immunitarie. I CAF, dopo l'attivazione, secernono numerose citochine e chemochine, tra cui osteopontina, CXCL1, CXCL2, CXCL12, CXCL13, IL-6, IL-1 β e CCL-5, importanti per richiamare cellule immunosoppressive nel TME. Inoltre, sono responsabili delle modifiche strutturali del tessuto mediante la deposizione di collagene e metalloproteasi della matrice (MMP) che contribuiscono alla migrazione delle cellule tumorali. (34;35)

All'interno del TME il cross-talk tra cellule immunitarie e cellule tumorali è un elemento chiave. Il TME immunosoppressivo che si crea è caratterizzato da una diminuzione delle cellule T CD8⁺ citotossiche e delle cellule NK ed un aumento delle cellule T CD8⁺ disfunzionali, Tregs, cellule T CD4⁺ che convertono verso il fenotipo Th2 proinfiammatorio. Le cellule mieloidi più abbondanti sono i TAM e i neutrofili associati al tumore (TAN) frequentemente indicativi di una prognosi sfavorevole. Queste cellule sostengono la proliferazione e l'evasione immunitaria attraverso il rilascio del fattore di crescita epidermica (EGF), fattore di crescita degli epatociti (HGF) e il TGF- β , IL-6 e IL-10. (33)

Il TME è governato da una rete di segnalazione intracellulare basata su specifici fattori di trascrizione. Uno dei principali è NF- κ B attivo costitutivamente in diversi tipi di tumore. NF- κ B influenza l'espressione di geni pro-infiammatori come TNF, IL-1, MMP-9 e di geni anti-apoptotici coinvolti nella sopravvivenza cellulare. Inoltre, la sua attivazione favorisce l'angiogenesi, principalmente attraverso la regolazione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). (36)

NF- κ B coopera strettamente con il trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3) che risulta essere iperespresso sia su cellule cancerogene che non cancerogene in diverse tipologie di neoplasie. (37)

Un processo cruciale nell'invasività tumorale e nelle metastasi è la EMT, un processo di riprogrammazione cellulare in cui le cellule epiteliali perdono le loro caratteristiche per acquisire il fenotipo mesenchimale. Questo processo conferisce alle cellule tumorali la capacità di attraversare strati epiteliali e mesenchimali in maniera altamente dinamica, possibilità che deriva anche dai cambiamenti morfologici cui va incontro la cellula.

La riprogrammazione fenotipica può essere totale o parziale, in particolare gli ultimi studi dimostrano come le popolazioni tumorali con EMT parziale siano le più pericolose perché in grado di metastatizzare molto velocemente. (38)

Nel complesso, l'infiammazione cronica emerge come punto chiave nella determinazione della tumorigenesi, influenzando le cellule tumorali, stromali e immunitarie e favorendo la progressione della malattia.

1.4 NEUTROFILI: BIOLOGIA E RUOLO NEL PDAC

I neutrofili, detti anche leucociti polimorfonucleati, sono la popolazione cellulare di globuli bianchi più abbondante circolante. Queste cellule svolgono un ruolo essenziale nella difesa dell'organismo da agenti patogeni mediante il rilascio di granuli contenenti enzimi e sostanze microbicide e fagocitando i microrganismi opsonizzati. I neutrofili vengono prodotti a livello del midollo osseo e, quando vengono rilasciati in circolo, hanno un'emivita relativamente breve che varia da poche ore ad un massimo di cinque giorni. (38)

I neutrofili sono le prime cellule ad essere richiamate nel sito d'infezione con una funzione limitata prevalentemente alla fase acuta della risposta infiammatoria. Tuttavia, studi recenti hanno rivalutato profondamente il ruolo di queste cellule evidenziando l'elevata eterogeneità funzionale e plasticità fenotipica, soprattutto in condizioni patologiche come malattie immuno-mediate, fibrosi e cancro. (40)

In questo contesto, molte evidenze sperimentali indicano i neutrofili come un elemento chiave nello sviluppo del PDAC, nella creazione di un TME immunosoppressivo adatto alla progressione del tumore e alla sua metastatizzazione.

1.4.1 Granulopoiesi e reclutamento nel tessuto tumorale

I neutrofili originano dalle cellule staminali ematopoietiche a lungo termine (LT-HSC) presenti nel midollo osseo e attraverso una serie di passaggi intermedi le LT-HSC danno origine ai progenitori granulociti-monociti (GMP) che rappresentano il punto di partenza per la differenziazione dei neutrofili. L'intero processo di granulopoiesi è finemente regolato dal fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), il quale controlla anche il rilascio dei neutrofili maturi nel circolo sanguigno. (39)

In condizioni fisiologiche, i neutrofili in circolo pattugliano l'organismo e, dopo il riconoscimento di un patogeno, rilasciano citochine e chemochine che favoriscono il reclutamento di altri neutrofili. In seguito a questo evento il sistema ematopoietico passa, da quella che viene definita granulocitosi stazionaria, ad una condizione di granulocitosi di emergenza, per far fronte alla rapida e massiva richiesta di neutrofili.

Oltre al G-CSF, anche il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) e IL-6 regolano la produzione di neutrofili durante la risposta infiammatoria. A livello molecolare, il fattore di trascrizione STAT3, ha un ruolo chiave in quanto promuove l'espansione dei progenitori mieloidi e il rilascio dei neutrofili nel sangue periferico. (40;41) Nel PDAC sono le stesse cellule tumorali a richiamare i neutrofili rilasciando G-CSF, GM-CSF e varie chemochine nel TME. Di conseguenza, la percentuale di neutrofili infiltranti nel PDAC è molto elevata rispetto alle condizioni fisiologiche.

Le cellule tumorali secernono chemochine appartenenti alla famiglia delle CXC, tra cui CXCL1-3, CXCL5-6, CXCL8, che richiamano i neutrofili attraverso il legame con i recettori CXCR1 e CXCR2 espressi sulla loro superficie. Una potente chemochina con attività chemiotattica nei confronti dei neutrofili è CXCL5, in particolare l'espressione di questa chemochina è associata alle cellule tumorali portatrici della mutazione di KRAS, una delle alterazioni genetiche più frequenti nel PDAC.

Il rilascio delle chemochine è sostenuto dall'attività costitutiva del fattore di trascrizione NF- κ B. In questo contesto, l'asse NF- κ B-chemochine-neutrofili ha un ruolo centrale nella biologia del PDAC.

Inoltre, l'interazione tra neutrofili e cellule endoteliali è potenziata dal legame tra l'angiopoietina-2 con il recettore TIE2 sulla superficie dei neutrofili. Questo legame stimola anche il rilascio di IL-8 che promuove la sopravvivenza delle cellule infiltranti. (42;43)

Le funzioni pro-tumorali dei neutrofili sono sostenute inoltre dai CAF mediante il rilascio di CXCL1, CXCL2 e G-CSF. (44)

I neutrofili richiamati nel TME esercitano numerose funzioni effettrici che influenzano la crescita tumorale, la sopravvivenza delle cellule infiltranti e la modulazione della risposta immunitaria.

1.4.2 Funzioni effettrici dei neutrofili nel tessuto tumorale

I neutrofili sono cellule essenziali per la difesa dell'organismo ma sono anche una delle principali popolazioni cellulari coinvolte nel sostegno della crescita tumorale.

Nel PDAC, così come in altri tumori, l'infiltrazione di neutrofili è associata a prognosi sfavorevole. Un parametro clinico che viene valutato è l'aumento del rapporto tra neutrofili e linfociti nel TME correlato ad una prognosi sfavorevole. L'alterazione di questo rapporto è influenzata anche da citochine e chemochine rilasciate dai TAN, come IL-10 e TNF- α , che riducono il numero di linfociti infiltranti e ne influenzano l'attività.

La stretta interazione tra neutrofili e TME, insieme ai fattori da essi rilasciati, contribuiscono all'acquisizione da parte dei neutrofili di caratteristiche funzionali tipiche dei TAN che possono esercitare funzione antitumore o protumorale. (45;46)

I TAN svolgono un ruolo centrale nella creazione di un ambiente immunosoppressivo attraverso l'interazione con diverse popolazioni immunitarie. Essi secernono CCL17 e CCL2 per reclutare Tregs e possono sopprimere l'attività delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ in seguito all'attivazione nei TAN della via GM-CSF-PD-L1, attivazione indotta dalle cellule tumorali. Anche l'attività citotossica delle cellule NK viene compromessa in seguito all'aumentata espressione di PD-L1 sulla superficie dei TAN. All'interno del TME, inoltre, i TAN cooperano con i TAM ed in particolare i TAN CCL4⁺ promuovono il reclutamento dei macrofagi e l'attivazione della via di segnalazione STAT3 cruciale per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. (47)

Inoltre, i TAN secernono alcune chemochine come CXCL-10 e CCL-21 che facilitano la migrazione delle cellule tumorali pancreatiche verso i neuroni sensoriali e questo spiega la comparsa di dolore nei pazienti affetti da PDAC. (46)

I TAN sono direttamente implicati in vari processi a sostegno della crescita tumorale come l'angiogenesi e le metastasi.

L'angiogenesi è regolata da tutte le componenti del TME e i TAN la promuovono rilasciando VEGF, MMP, diverse citochine e formando NET. MMP-9, è contenuta in elevate quantità nei granuli terziari, e quando viene rilasciata mobilita il VEGF e aumenta l'invasione del tumore scindendo le proteine dell'ECM. (45;46)

I TAN possono favorire la migrazione delle cellule immunitarie rilasciando TNF- α , IL-1 β e il leucotriene B4. Molto importante nel tessuto pancreatico è inoltre la cooperazione tra i TAN, le PSC e gli adipociti, infatti, le cellule adipose disfunzionali secernono citochine, come IL-1 β , che attivano le PSC e reclutano i TAN, i quali secernono a loro volta IL-1 β che agisce sulle altre cellule. (45)

Un'altra funzione dei TAN, che oggi è un punto cardine della ricerca, è il rilascio di filamenti di DNA cromatinico, noti come *Neutrophil extracellular traps* (NETs), sui quali si trovano proteine granulari come mieloperossidasi (MPO), proteinasi3, MMP-9 e proteine nucleari come l'istone citrullinato H3 (H3Cit). Le NETs possono essere rilasciate in seguito a stimoli infettivi e non infettivi ma la loro presenza come infiltrati tumorali è associata a prognosi sfavorevole. Le cellule tumorali attraverso il rilascio di IL-8 e G-CSF stimolano il rilascio di questi filamenti cromatinici. (48) Il contributo nella metastatizzazione deriva principalmente dalla capacità delle NETs di intrappolare le cellule tumorali e di promuovere EMT mediante la sovraregolazione di proteine strutturali mesenchimali come vimentina e α -actina del muscolo liscio (α -SMA). (49)

1.4.3 Polarizzazione e plasticità dei neutrofili nel PDAC

Nel PDAC la percentuale di neutrofili infiltranti è molto elevata. Questo è dovuto, almeno in parte, ai numerosi fattori secreti dalle cellule tumorali che ne promuovono il reclutamento. Nelle prime fasi del tumore, i neutrofili infiltranti mostrano prevalentemente caratteristiche anti-tumorigeniche mentre, con la progressione del tumore, e in risposta alle molecole rilasciate nel TME, essi convergono verso un fenotipo pro-tumorigenico. (42)

All'interno del TME la popolazione di neutrofili è considerata altamente eterogenea, caratteristica dipendente dal rilascio di neutrofili immaturi dal midollo osseo in seguito all'attivazione della granulopoiesi di emergenza. L'eterogeneità dei neutrofili è associata anche alla differenza nel contenuto dei granuli che implica una diversificazione funzionale

e fenotipica, comunemente nota come polarizzazione, in neutrofili N1 antitumorali e neutrofili N2 protumorali.

I neutrofili N1 sono caratterizzati da un nucleo ipersegmentato, da una breve emivita e da una marcata attività citotossica. Al contrario, i neutrofili N2 presentano un nucleo più circolare, bassa tossicità e svolgono un ruolo chiave della promozione di angiogenesi, metastatizzazione e immunosoppressione. (42;50)

La polarizzazione dei neutrofili è governata principalmente dalle molecole rilasciate dalle cellule tumorali e dagli altri componenti del TME.

Citochine come $\text{INF-}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ promuovono la polarizzazione dei neutrofili verso il fenotipo N1 mentre $\text{TGF-}\beta$ e IL-1 promuovono la conversione verso il fenotipo N2.

I neutrofili N1 e N2 possono essere distinti anche in base dell'espressione di marker superficiali differenti. I neutrofili N1 up-regolano FasR, associato a stati di attivazione e apoptosi, ICAM-1, che promuove l'interazione cellulare e l'adesione, e producono elevate quantità di CCL3 e $\text{TNF-}\alpha$. I neutrofili con fenotipo immunosoppressivo N2 invece sono caratterizzati da un'elevata espressione di CXCR2, coinvolto nel reclutamento e nella migrazione, di CD62L (L-selectina) e dalla secrezione di diverse chemochine.

L'azione antitumorale esercitata dai neutrofili N1 è principalmente dipendente dalla produzione di ROS che esercitano un effetto citotossico diretto contro le cellule tumorali. Tuttavia, i ROS agiscono anche in maniera indiretta inibendo le cellule T $\gamma\delta$ produttrici di IL-17 e riducendo in questo modo i segnali pro-tumorali nel TME. Inoltre, i neutrofili N1 attivati rilasciano grandi quantità di citochine pro-infiammatorie come $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 per il reclutamento dei CTL.

I neutrofili N2 invece quando vengono attivati secernono citochine come IL-10 , $\text{TGF-}\beta$, VEGF e IL-8 che contribuisce ad aumentare il reclutamento di altri neutrofili e cellule immunitarie nel TME. La loro funzione immunologica è principalmente associata alla produzione di arginasi-1 (ARG-1) che inibisce il funzionamento dei linfociti T ed MMP-9 per la degradazione della matrice extracellulare. I neutrofili N2 inoltre promuovono la progressione del tumore rilasciando le NETs. (42; 47)

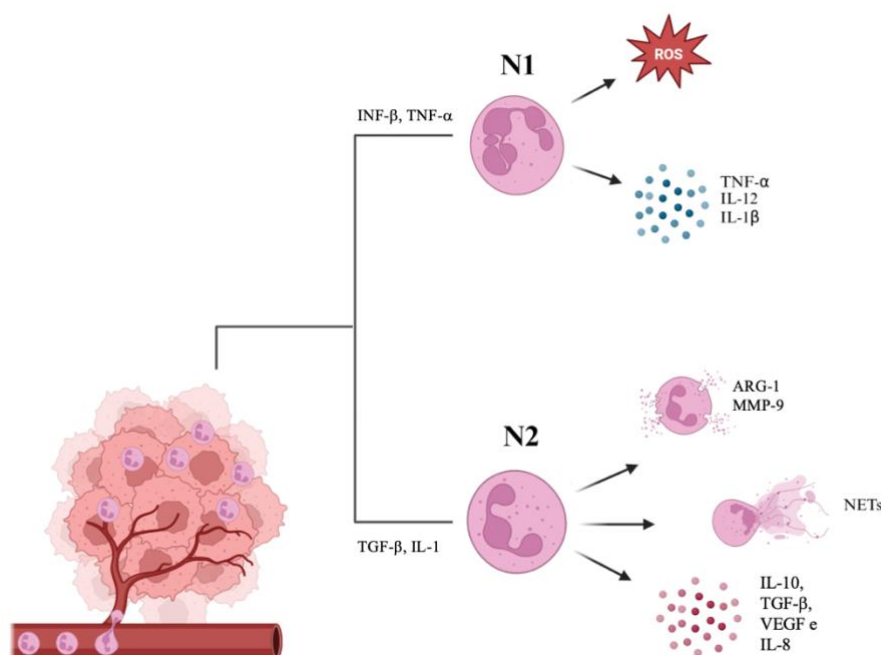


Figura 5 Rappresentazione della polarizzazione dei neutrofili in risposta alle citochine rilasciate nel microambiente tumorale. La figura mostra le funzioni effettrici dei neutrofili polarizzati N1 (anti-tumoral) e N2 (pro-tumoral)

La classificazione dei neutrofili in N1 e N2, sebbene in parte concettualmente corretta, rappresenta probabilmente una semplificazione della reale complessità dell'infiltrato nucleofilo che risulta altamente eterogeneo. A supporto di questa osservazione, Wang et al. in uno studio hanno identificato differenti sottopopolazioni di TANs mediante l'analisi di single-cell RNA sequencing, classificandoli sulla base del profilo di espressione genica.

Le sottopopolazioni descritte sono:

- TAN-0: un cluster con caratteristiche non distintive poiché i geni espressi risultano condivisi con altre sottopopolazioni;
- TAN-1: una sottopopolazione pro-tumorale caratterizzata dall'espressione di elevati livelli di fattori pro-angiogenici e pro-metastatici;
- TAN-2: una sottopopolazione infiammatoria che favorisce la progressione tumorali;
- TAN-3: una sottopopolazione in fase di transizione costituita da neutrofili appena migrati da circolo sanguigno al TME;

- TAN-4: una sottopopolazione caratterizzata dall'espressione di geni dipendenti dalla stimolazione dell'IFN, potenzialmente sono neutrofili immunostimolanti. (51)

A questo proposito, diversi studi hanno posto l'attenzione sui neutrofili e sul loro ruolo biologico all'interno del tumore. Ad oggi, sono stati compiuti significativi progressi ma la comprensione del ruolo funzionale dei diversi sottotipi di neutrofili non è ancora completamente definita. Sono necessarie ulteriori ricerche scientifiche per comprendere in maniera approfondita qual è la comunicazione tra neutrofili e cellule tumorali e le relative conseguenze biologiche di tale interazione per poter sfruttare questi meccanismi come potenziali strategie terapeutiche nel trattamento del cancro.

2 Scopo del lavoro

I neutrofili sono cellule chiave del sistema immunitario innato e rappresentano la prima linea di difesa dell'organismo contro agenti patogeni. Vengono prodotti nel midollo osseo e, in condizioni di infezione o infiammazione, il loro rilascio nel circolo ematico aumenta in maniera esponenziale. Il ruolo dei neutrofili è sempre stato associato alla fase acuta dell'infezione ma studi recenti hanno ridefinito questa visione dimostrando come la loro funzione non sia così limitata, infatti, queste cellule sono implicate nella risposta immunitaria adattativa e nel rimodellamento tissutale. In questo contesto, i neutrofili sono spesso associati a condizioni patologiche come malattie immuno-mediate, fibrosi e cancro. Negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta al loro coinvolgimento nel PDAC, una delle neoplasie con il tasso di mortalità più elevato a livello globale. La letalità del PDAC è da attribuire a differenti fattori: la diagnosi avviene frequentemente in stadio avanzato quando la resezione chirurgica non è più praticabile, la malattia progredisce spesso senza dare sintomi specifici, non ci sono biomarcatori sensibili per la diagnosi precoce e la posizione anatomica del pancreas rende complessa una valutazione di routine.

Inoltre, nel TME i neutrofili, in base agli stimoli, possono andare in contro ad uno switch fenotipico verso uno stato funzionale N1, caratterizzato da attività anti-tumorali o verso un fenotipo N2 associato a funzioni pro-tumorali. In particolare, i neutrofili N2 sostengono la crescita tumorale rilasciando citochine anti-infiammatorie, ARG-1 ed MMP-9 e mediante la formazione delle NETs.

Alla luce del crescente interesse verso il ruolo dei neutrofili nel TME del PDAC, il mio lavoro di tesi si propone di indagare le interazioni tra neutrofili e cellule tumorali pancreatiche, al fine di comprendere come tali interazioni possano contribuire alla modulazione del fenotipo e delle funzioni dei neutrofili. In particolare, analizzando il rilascio di molecole associate alla progressione tumorale, quali ARG-1 e MMP-9 mediante analisi Western blot.

Inoltre, è stata analizzata la formazione delle NETs attraverso esperimenti time-course e caratterizzazione immunocitochimica di specifiche proteine quali mieloperossidasi (MPO), istone H3 citrullinato (citH3), ARG-1 e MMP-9.

Nel complesso, l'obiettivo dello studio è quello di comprendere i meccanismi attraverso cui le cellule tumorali pancreatiche possono influenzare l'attività dei neutrofili nel TME, fornendo potenziali basi per lo sviluppo di future strategie terapeutiche.

3 Materiali e Metodi

3.1 Colture cellulari

In questo progetto di tesi sono state utilizzate tre linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano denominate DAN-G, PaCa-44 e PT-45. Il terreno di coltura utilizzato per tutte le linee è stato RPMI completato con 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% L-glutammina 2mM, 0.5% kanamicina, 5% aminoacidi non essenziali e 5% sodio piruvato. Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37° in atmosfera umidificata con una pressione del 5% di CO₂. Gli esperimenti sono stati condotti in cappe a flusso laminare verticale in condizioni sterili e con l'utilizzo di materiali sterili.

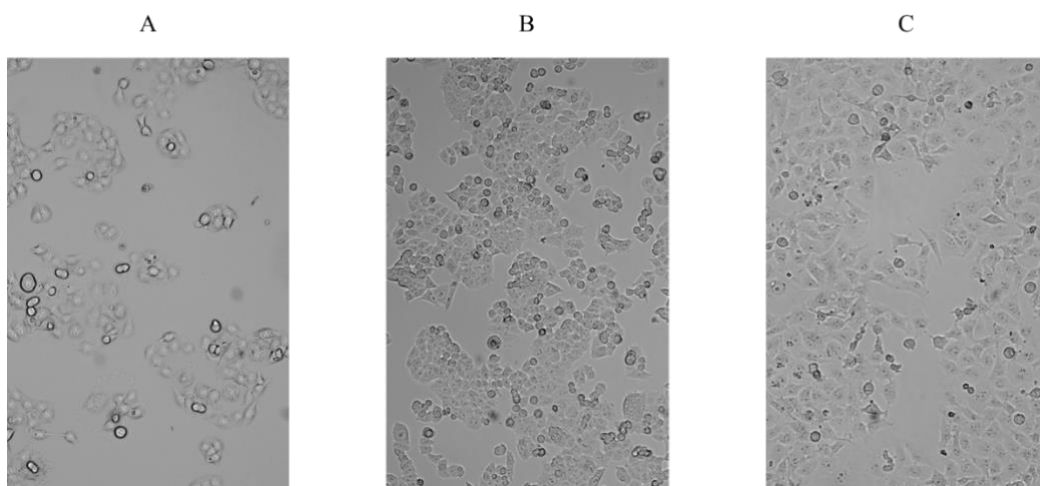


Figura 6 *A. DANG, B. PaCa-44, C. PT-45. Le immagini sono state acquisite con microscopio a contrasto di fase, magnificazione 10x*

3.2 Isolamento dei neutrofili

I neutrofili sono stati isolati da campioni di sangue periferico prelevati da volontari sani previa la firma del consenso informato.

L'isolamento è stato effettuato seguendo uno specifico protocollo e tutte le fasi sono state eseguite in condizioni di sterilità utilizzando una cappa a flusso laminare verticale.

Le provette contenenti il sangue vengono portate sotto cappa e 20 mL di sangue vengono spostati in falcon e successivamente diluiti con 20 mL di PBS 1x, a questi vengono aggiunti 10 mL di una soluzione fisiologica contenente 3% di destrano. Il destrano favorisce la sedimentazione degli eritrociti: si formerà un surnatante arricchito di leucociti ed un pellet

eritrocitario. Il campione viene lasciato a temperatura ambiente ed al buio per 30 minuti, successivamente viene recuperato il surnatante in una nuova falcon che verrà centrifugata per 10 minuti a 1200 rpm. Terminata la centrifuga, si elimina il surnatante ed il pellet viene prima risospeso manualmente e successivamente in 8 mL di PBS 1x.

Il pellet risospeso viene stratificato, goccia a goccia, in una nuova falcon dove sono stati precedentemente depositati 4 mL di Ficoll-Paque, questo consente la separazione delle diverse componenti cellulari per gradiente di densità. Si esegue quindi una centrifuga a 1800 rpm per 15 minuti senza freno.

Al termine della centrifuga si ottiene una stratificazione caratteristica costituita da: plasma, anello PBMC, Ficoll-Paque, granulociti ed eritrociti. Mediante l'utilizzo del pipettatore tutti gli strati vengono eliminati per lasciare solamente lo strato contenente granulociti ed eritrociti. Per eliminare gli eritrociti si effettua una lisi osmotica risospendendo il pellet in 7 mL di NaCl 0,2% e dopo 30 secondi 7 mL di NaCl 1,6% per ritornare ad una soluzione fisiologica 0,9% NaCl. Il campione viene centrifugato a 900 rpm per 5 minuti.

Conclusa la lisi i neutrofili vengono lavati in PBS 1x ed infine risospesi in 3 mL di terreno RPMI per effettuare la conta cellulare e poi piastrati in terreno di coltura RPMI completo.

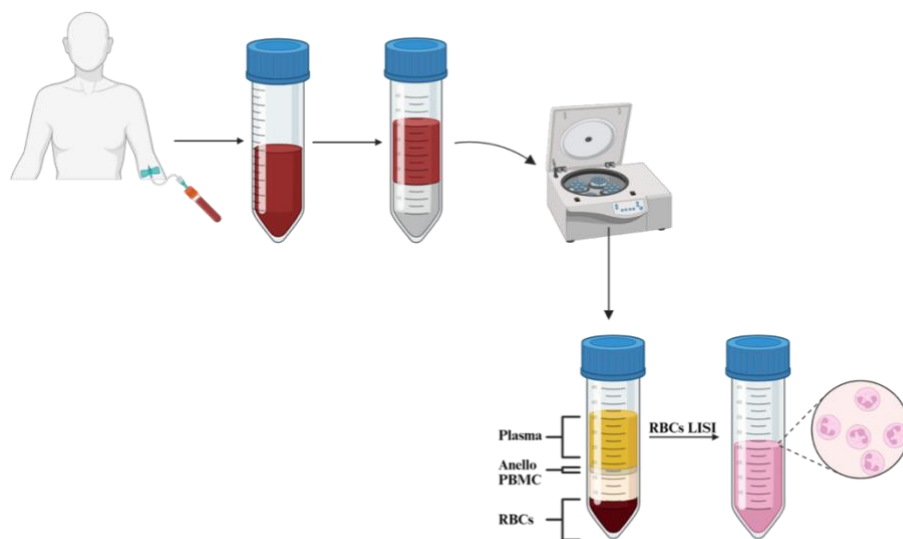


Figura 7 Rappresentazione schematica del processo di isolamento dei neutrofili

3.3 Western Blot

La tecnica del Western Blot è stata utilizzata per valutare l'espressione delle proteine di interesse. Prima del Western Blot viene eseguita un'estrazione chimica delle proteine da pellet cellulare, mediante l'utilizzo del RIPA buffer. Il RIPA buffer viene preparato prima di ogni estrazione aggiungendo alla soluzione base inibitori di proteasi e di fosfatasi. Dopo l'aggiunta del RIPA buffer, i campioni vengono mantenuti in ghiaccio 30 minuti e successivamente centrifugati a 13.000 rpm per 10 minuti a 4°C per separare i detriti cellulari dall'estratto proteico. I surnatanti sono trasferiti in nuove eppendorf e quantificati mediante saggio BCA (Bicinchoninic Acid assay), l'assorbanza dei campioni viene misurata alla lunghezza d'onda di 562 nm.

Si prosegue poi preparando i campioni come segue: 20 µg estratto proteico, Laemmli buffer addizionato di β-mercaptoetanololo e acqua. Le proteine contenute in ogni campione vengono separate mediante corsa elettroforetica in base al loro peso molecolare, il gel utilizzato è di poliacrilamide al 12%.

Segue, mediante elettroblotting, il trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa.

La membrana viene bloccata, in modo da saturare i legami aspecifici, con una soluzione al 5% p/v di latte scremato Regilait per un'ora a temperatura ambiente.

Successivamente, la membrana viene incubata, overnight, con l'anticorpo primario di interesse diluito in una soluzione 3% BSA in TBS-T. Il giorno seguente la membrana viene lavata con TBS-T per 30 minuti e successivamente incubata con l'anticorpo secondario HRP nello stesso buffer dell'anticorpo primario. Terminata l'incubazione la membrana viene nuovamente lavata 30 minuti con TBS-T e acquisita al Chemidoc (BioRad) dopo aver sviluppato il segnale usando un kit di chemiluminescenza. L'intensità del segnale è stata misurata tramite il programma Image Lab (BioRad).

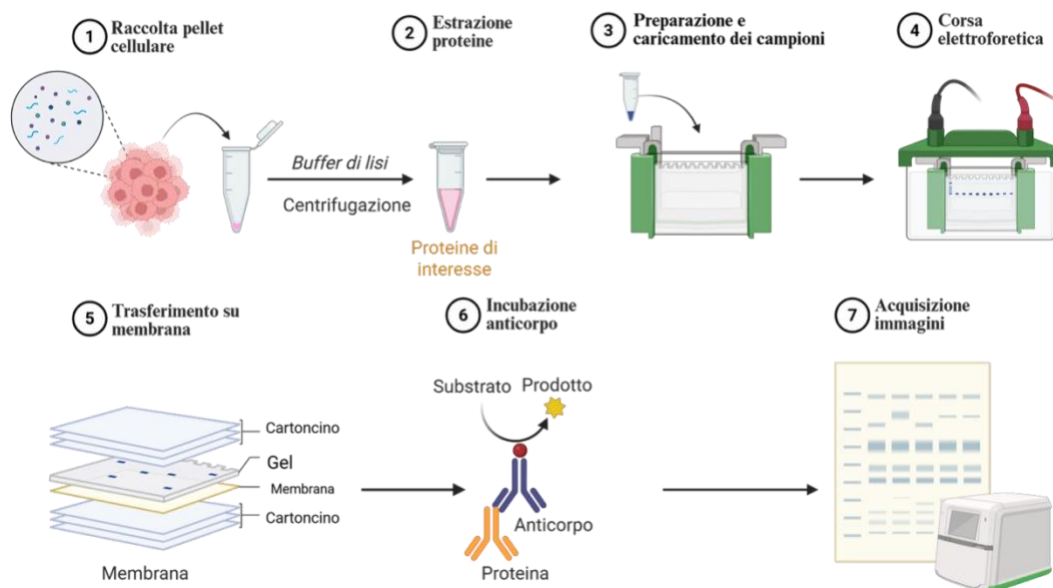


Figura 8 Rappresentazione schematica protocollo Western Blot

3.4 ELISA

Il saggio ELISA è stato utilizzato per determinare la concentrazione di IL-8 rilasciata nel medium cellulare dalle diverse linee utilizzate in questo progetto.

Il kit utilizzato, in particolare, è per un saggio immunoenzimatico sandwich quantitativo ELISA. Seguono gli step:

- Immobilizzazione dell'anticorpo monoclonale specifico per IL-8 denominato anticorpo di cattura. Questo è stato preparato diluendolo come riportato dal protocollo e dispensato in una piastra multi-pozzetto da 96 incubata per tutta la notte a 4° C
- Lavaggio per eliminare l'anticorpo residuo
- Blocco per 1 ora a temperatura ambiente, questo serve a impedire legami aspecifici
- Aggiunta dello standard e dei campioni opportunamente diluiti, incubazione di 2 ore a temperatura ambiente
- Lavaggi per eliminare segnali aspecifici

- Aggiunta di anticorpo secondario biotinilato e incubazione per 1 ora a temperatura ambiente
 - Lavaggi per eliminare segnali aspecifici
 - Aggiunta di streptavidina e tetrametilbenzidina per consentire lo sviluppo di colore. La reazione è stata poi bloccata mediante l'aggiunta dopo 15 minuti di incubazione di una soluzione 2 N di acido solforico.
 - Acquisizione del segnale 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.

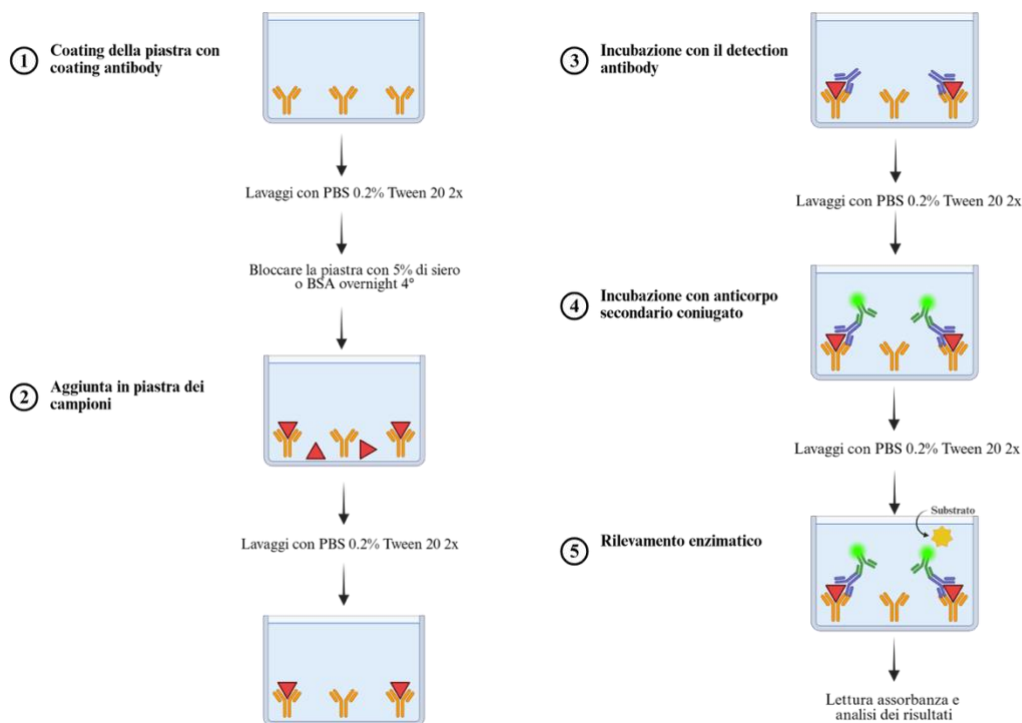


Figura 9 Rappresentazione schematica protocollo sandwich ELISA

3.5 Induzione delle NETs

I neutrofili sono stati piastrati a una densità di 200.000 cellule/pozzetto in una piastra a 24 pozzetti contenete vetrini coprioggetto sterili. Per valutare l'adesione dei neutrofili al vetrino sono state eseguire delle prove su vetrini non rivestiti e vetrini sui quali è stato eseguito un rivestimento di poli-L-lisina ed incubando i neutrofili per 3 ore al fine di favorire l'adesione. terminate le 3 ore di incubazione sono stati effettuati due lavaggi in PBS 1X sterile ed è risultato come i neutrofili fossero maggiormente adesi sui vetrini rivestiti con poli-L-lisina per cui sono stati utilizzati questi per condurre l'esperimento.

Per promuovere la formazione delle NETs è stato aggiunto Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), ad una concentrazione finale di 100nM, e le cellule sono state incubate per 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 3 ore e 4 ore al fine di valutare come nel tempo avviene il rilascio delle NETs. Finito il tempo di incubazione, i vetrini sono stati lavati in PBS 1x e fissati con una soluzione contenente il 4% di paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente. Concluso il fissaggio, i vetrini sono stati lavati per 5 in PBS 1x ripetuto per 3 volte ed infine conservati a +4°C in camera umida.

3.6 Immunocitochimica (ICC)

L'immunocitochimica è una tecnica di laboratorio che consente di visualizzare in cellula proteine di interesse sfruttando anticorpi legato ad un fluoroforo, che quindi quando eccitati ad una determinata lunghezza d'onda sono in grado di generare un segnale fluorescente. Con questa tecnica è quindi possibile valutare la presenza di proteine e anche determinare la loro localizzazione nella cellula. Nel mio progetto di tesi, questa tecnica è stata utilizzata per verificare la formazione di NETs dopo stimolazione con PMA. Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- 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 PBS 1x 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
- Incubazione con DAPI diluito in PBS 1x, colorante fluorescente che si lega preferenzialmente alle regioni del DNA ricche in adenina e timina, consentendo la visualizzazione dei nuclei
- Lavaggio con PBS 1x da 3 minuti ripetuto per 5 volte
- Lavaggio in acqua sterile per 5 minuti
- Montaggio su vetrini

I vetrini sono stati poi acquisiti al microscopio a fluorescenza invertito.

4 Risultati e discussione

4.1 Valutazione del rilascio di IL-8 mediante saggio ELISA

IL-8 è una chemochina pro-infiammatoria descritta 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. In diversi tumori solidi come melanoma, glioma, cancro al colon e al pancreas i livelli di IL-8 sono risultati elevati. In particolare, nel PDAC aumentano significativamente i livelli di IL-8 secreti al fine di supportare un ambiente immunosoppressivo, promuovere l'angiogenesi e quindi la vascolarizzazione del TME. (52)

Il primo esperimento che abbiamo svolto è quindi stato un saggio ELISA al fine di valutare se le nostre linee di PDAC fossero in grado di rilasciare IL-8 nel medium cellulare. I dati ottenuti e riportati in *Figura 10* hanno evidenziato come le tre linee prese in esame siano in grado di rilasciare nel microambiente IL-8 a diverse concentrazioni. I livelli maggiori sono stati ottenuti esaminando il medium cellulare della linea DAN-G, a seguire la linea PT-45 e poi PaCa-44 che ha mostrato livelli più bassi tra le 3 linee. Questo aspetto è molto rappresentativo del tumore al pancreas, infatti questo tumore è contraddistinto da zone calde e zone fredde. Le prime presentano un'elevata infiltrazione di cellule immunitarie effettrici, in particolare linfociti T CD8⁺ attivati, cellule NK e DC che creano un microambiente infiammatorio in grado di promuovere una risposta immunitaria antitumorale efficace. Le zone fredde invece sono caratterizzate da una scarsa infiltrazione di linfociti T CD8⁺, spesso confinati alla periferia della massa tumorale, e una vascolarizzazione disorganizzata che genera un microambiente ipossico e acido che contribuisce alla progressione tumorale. In particolare, alcune chemochine pro-tumorali come IL-8 sono frequentemente espresse da cellule tumorali, favoriscono il reclutamento di neutrofili e MDSC e promuovono caratteristiche associate ai tumori "freddi". Questo supporta l'idea che le chemochine rilasciate nel TME possano modulare attivamente sia l'infiltrazione che la funzione delle cellule del sistema immunitario. (16,17)

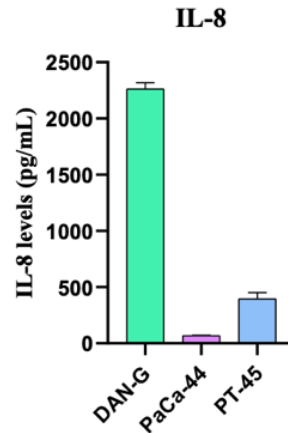


Figura 10 Livelli di IL-8 rilasciati dalle tre linee di adenocarcinoma duttale pancreatico

4.2 Valutazione dello switch funzionale neutrofilico

I neutrofili, negli ultimi anni, sono emersi come cellule altamente plastiche in grado di cambiare il fenotipo a seconda degli stimoli con cui entrano a contatto. In particolare, in contesto tumorale vengono classificati in due fenotipi funzionali: neutrofili N1 anti-tumoral e neutrofili N2 pro-tumoral. Il fenotipo N1, indotto prevalentemente dagli IFN-I, esercita un'azione citotossica nei confronti delle cellule tumorali attraverso il rilascio di ROS e di citochine pro-infiammatorie. Al contrario, il fenotipo N2 è favorito dall'esposizione a TGF- β e promuove la progressione tumorale mediante attività immunosoppressive, pro-angiogeniche e pro-metastatiche, sostenute dal rilascio di citochine quali TGF- β e IL-4. (47)

Un primo obiettivo del mio progetto di tesi è stato quello di indagare il cambiamento fenotipico dei neutrofili in risposta alle linee DAN-G, PaCa-44 e PT-45 di PDAC.

4.3 Polarizzazione dei neutrofili

Per analizzare il processo di polarizzazione dei neutrofili è stato messo a punto un protocollo sperimentale, articolato su più giorni, con l'obiettivo di monitorare e controllare accuratamente le variabili biologiche e tecniche coinvolte.

- **Giorno 1:** si seminano le linee di PDAC con una densità cellulare di 300.000 cellule/pozzetto preparando due piastre a 6 pozzetti per analizzare due condizioni temporali di polarizzazione a 6 ore e 16 ore. Le cellule vengono quindi incubate per tutta la notte in incubatore a 37° in atmosfera umidificata come una pressione del 5% di CO₂ al fine di consentire l'adesione cellulare.
- **Giorno 2:** viene controllato il raggiungimento della confluenza, il medium viene eliminato e sostituito con terreno fresco aggiungendo 1.5 mL di terreno per pozzetto. Questo consentirà il giorno dopo di avere il terreno condizionato con i fattori rilasciati dalle cellule tumorali per 24 ore.
- **Giorno 3:** si inizia isolando i neutrofili seguendo il protocollo riportato in materiali e metodi. Successivamente viene prelevato 1 mL di medium condizionato da ciascuna linea cellulare delle piastre preparate il giorno 1 e trasferito in una nuova piastra da 6 pozzetti. Si risospendono i neutrofili isolati in RMPI a una densità 1.000.000 cellule/mL e si procede piastrando 1 mL di neutrofili per pozzetto, in questo modo il rapporto tra medium condizionato e medium fresco sarà di 1:1. Mantenendo la stessa densità cellulare, i neutrofili vengono co-coltivati con le diverse linee cellulari in modo da avere un rapporto cellule tumorali e neutrofili di 1:2. Vengono inoltre preparati dei pozzetti di controllo piastrando i neutrofili in RMPI fresco. Le piastre vengono incubate a 37° in atmosfera umidificata come una pressione del 5% di CO₂ rispettivamente per 6 ore e 16 ore. Terminata la prima tempistica, i neutrofili vengono centrifugati e stoccati a -80°C.
- **Giorno 4:** si procede alla raccolta dei neutrofili incubati per 16 ore come riportato per la prima tempistica.

I pellet cellulari ottenuti verranno utilizzati per analisi Western Blot al fine di valutare l'espressione di proteine di interesse.

4.4 Valutazione espressione di ARG-1 mediante analisi Western Blot

ARG-1 è un enzima usato spesso come marcatore per i neutrofili e i macrofagi polarizzati verso il fenotipo immunosoppressivo ma è anche un enzima metabolico che scompone L-arginina in urea e ornitina inibendo in questo modo l'attivazione delle cellule T CD8⁺ bloccandone l'attività antitumorale. (53)

Nel nostro sistema sperimentale sono stati valutati, mediante analisi Western Blot, i livelli di ARG-1 espressi dai neutrofili, piastrati sia in medium condizionati che in co-cultura con le tre linee di PDAC a due differenti tempistiche. I dati relativi alla prima tempistica di 6h sono riportati in *Figura 11*.

Un incremento più evidente si osserva esclusivamente nei neutrofili coltivati in presenza di medium condizionato dalla linea DAN-G rispetto ai neutrofili in co-cultura. Un' ipotesi è che il contatto cellula-cellula possa promuovere una polarizzazione mista N1 e N2, mentre i fattori rilasciati nel medium polarizzano principalmente N2. Per quanto riguarda la linea PaCa-44, i livelli di ARG-1 risultano sostanzialmente sovrapponibili tra le diverse condizioni, con un lieve aumento nella co-cultura rispetto al medium condizionato. Nella linea PT-45, invece, si osserva una tendenza opposta, con livelli leggermente più elevati nei neutrofili trattati con medium condizionato rispetto alla co-cultura diretta.

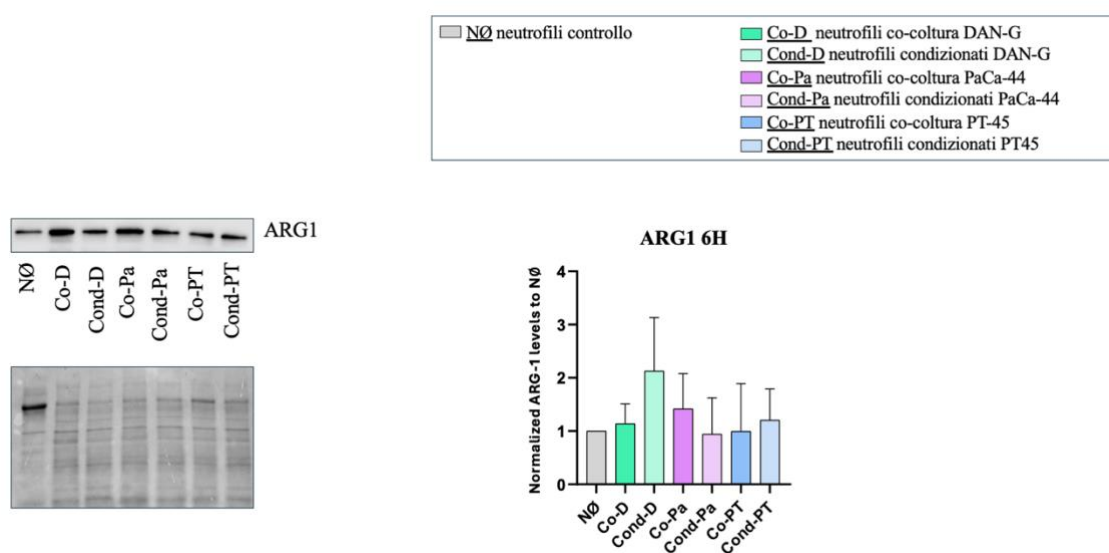


Figura 11 Livelli di ARG-1 espressi dai neutrofili condizionati e in co-cultura dopo 6h

I livelli di ARG-1 espressi dai neutrofili sono stati valutati dopo 16 ore di stimolazione e i risultati ottenuti sono riportati in *Figura 12*. In particolare, la co-cultura con la linea DAN-G ha determinato un marcato incremento dell'espressione di ARG-1 rispetto ai neutrofili esposti al solo medium condizionato della stessa linea tumorale, suggerendo un possibile contributo del contatto diretto cellula-cellula nella modulazione del fenotipo neutrofilico. Al contrario, la linea PaCa-44 ha mostrato una capacità minima di indurre il rilascio di ARG-1,

sia in co-coltura sia in presenza di medium condizionato. Per quanto riguarda la linea PT-45, si osserva un aumento più evidente dei livelli di ARG-1 nei neutrofili trattati con il medium condizionato rispetto alla co-coltura diretta, indicando un ruolo predominante dei fattori solubili nel promuovere tale risposta.

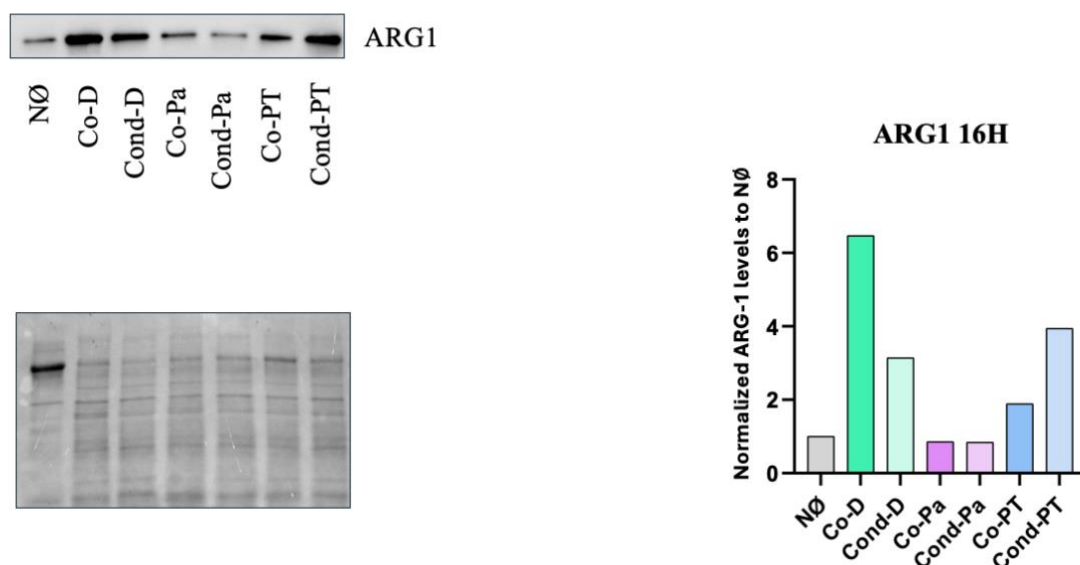


Figura 12 Livelli di ARG-1 espressi dai neutrofili condizionati e in co-coltura dopo 16h

Complessivamente, i dati ottenuti suggeriscono che nelle fasi precoci l'induzione di ARG-1 sia ancora limitata. Al contrario, a 16 ore emerge un quadro più definito e differenziale tra le linee tumorali, a confermare l'eterogeneità biologica del PDAC di modulare il microambiente immunitario. Il dato più interessante riguarda la linea DAN-G, l'aumento di espressione nei neutrofili in co-coltura apprezzabile dopo 16 ore potrebbe essere dovuto ad una ripolarizzazione verso fenotipo N2.

Nel contesto del tumore al pancreas ARG-1 svolge un ruolo chiave nell'immunosoppressione del TME come evidenziato da Menjivar et al., i quali hanno dimostrato che l'inibizione genetica o farmacologica di ARG-1 in macrofagi e neutrofili aumenta l'infiltrazione e l'attivazione dei linfociti T CD8⁺, riducendo la soppressione immunitaria e rallentando la progressione tumorale. (53) I nostri dati suggeriscono una polarizzazione N2, questo incremento potrebbe inibire l'attivazione dei linfociti T CD8⁺, per verificare questa ipotesi sarà necessario condurre esperimenti mirati.

4.5 Valutazione espressione di MMP-9 mediante analisi Western Blot

MMP-9 è una proteina costitutivamente presente nei granuli terziari dei neutrofili che viene rilasciata in risposta a stimoli infiammatori. Si tratta di un enzima proteolitico coinvolto nel rimodellamento dell'ECM; per questo motivo, lo studio del suo ruolo nel TME del PDAC risulta particolarmente rilevante. L'MMP-9 rilasciata dai neutrofili, infatti, esercita un effetto pro-angiogenico, contribuisce a promuovere la migrazione delle cellule endoteliali, i processi di invasione e metastatizzazione tumorale. (44)

I livelli di MMP-9 espressi dai neutrofili sono stati valutati mediante analisi Western Blot e i livelli di proteina prodotta dopo 6h sono riportati in *Figura 13*. Rispetto ai neutrofili di controllo non si osservano variazioni significative fatta eccezione per i neutrofili piastrati in medium condizionato delle DAN-G, nei quali si osserva un incremento nella produzione di MMP-9. Per la linea tumorale PaCa-44, i livelli di MMP-9 nelle due condizioni sperimentali sono simili, con un lieve aumento nei neutrofili condizionati. Situazione opposta si osserva nel trattamento dei neutrofili con la linea PT-45, i neutrofili piastrati in medium condizionato presentano un maggior produzione di MMP-9 rispetto ai neutrofili condizionato, sebbene rimanga sempre inferiore ai livelli prodotti dai neutrofili controllo.

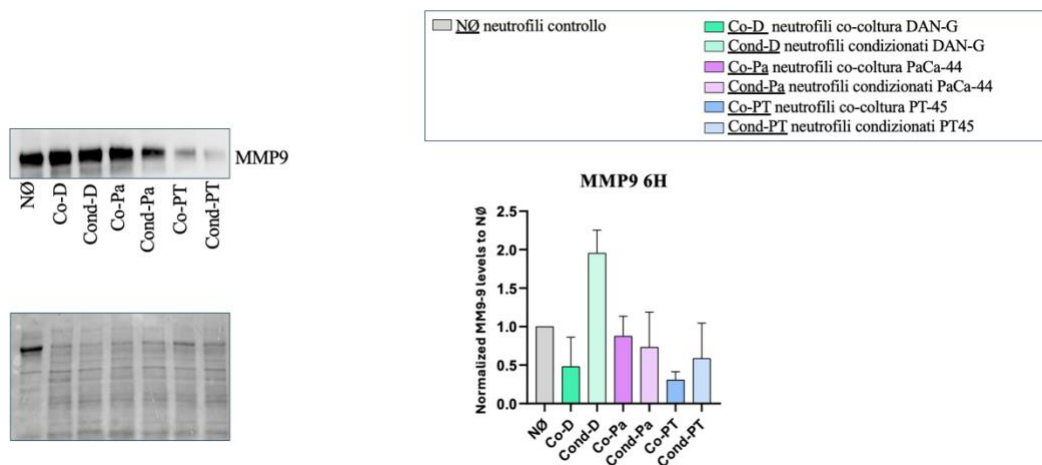


Figura 13 Livelli di MMP-9 espressi dai neutrofili condizionati e in co-cultura dopo 6h

La stessa valutazione è stata effettuata dopo 16h e i dati ottenuti sono riportati in *Figura 14*. Anche dopo 16h i neutrofili piastrati in medium condizionato derivato dalle DANG mostrano livelli significativamente elevati di MMP-9 rispetto al controllo. Diversamente da quanto osservato a 6 ore, la co-cultura diretta tra neutrofili e DANG induce anch'essa un aumento dell'espressione proteica. Al contrario, i neutrofili in co-cultura con PaCa-44 e PT-45 non mostrano differenze significative rispetto al trattamento a 6 ore.

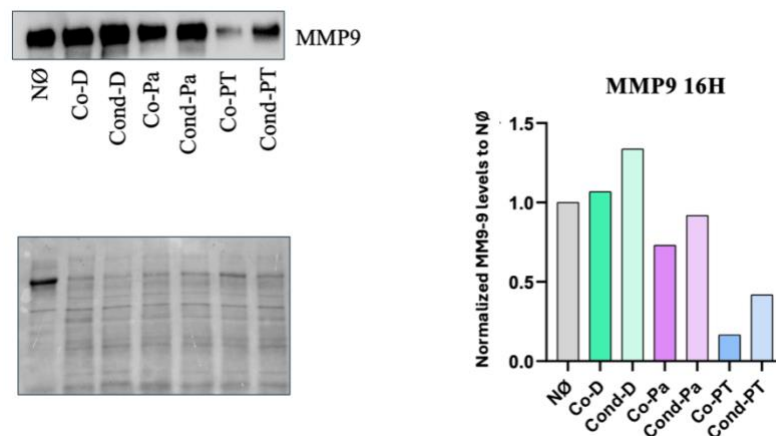


Figura 14 Livelli di MMP-9 espressi dai neutrofili condizionati e in co-cultura dopo 16h

Confrontando i dati ottenuti nelle due tempistiche si mette in evidenza che DAN-G è la linea che stimola maggiormente la produzione di MMP-9 da parte dei neutrofili, tale effetto inoltre non necessita di un contatto diretto cellula-cellula ma può essere mediato anche dai soli fattori solubili rilasciati dalle cellule tumorali. Al contrario, i dati ottenuti per i neutrofili condizionati ed in co-cultura con la linea PaCa-44 non mostrano significative differenze rispetto al controllo mentre vediamo una diminuzione di espressione per la linea PT-45. Come per i dati ottenuti in precedenza, si evidenzia come le DAN-G mostrino una capacità elevata di polarizzare i neutrofili, anche in questo esperimento, verso un fenotipo N2.

4.6 Rilascio di NETs

Tra le funzioni esplicate dai neutrofili rientra il rilascio di trappole extracellulari costituite da cromatina decondensata, sulla quale risultano ancorate proteine normalmente contenute nei granuli neutrofilici. Questo processo, noto come NETosi, rappresenta un importante meccanismo di difesa dell'immunità innata: in condizioni fisiologiche, infatti, i neutrofili rilasciano tali strutture al fine di intrappolare i patogeni, limitarne la diffusione e promuoverne la degradazione. Studi recenti hanno tuttavia evidenziato che anche i neutrofili associati al tumore sono in grado di espletare questa funzione. In particolare, il sottotipo N2, caratterizzato da un fenotipo pro-tumorale, mostra un rilascio di NETs associato alla promozione della migrazione delle cellule tumorali nel torrente circolatorio. Questo meccanismo sembra contribuire allo spread tumorale, favorendo i processi di disseminazione e metastatizzazione. (49)

Nel mio progetto di tesi, l'obiettivo è stato quello di definire un protocollo che consentisse la visualizzazione delle NETs mediante immunocitochimica, attraverso la marcatura di proteine caratteristiche della NETosi quali MPO e CitH3.

Al fine di promuovere il loro rilascio i neutrofili sono stati stimolati con PMA 100 nM a diverse tempistiche per definire l'andamento del processo.

I dati riportati in *Figura 15*, mostrano come con l'avanzare del tempo di esposizione allo stimolo ci sia una riorganizzazione della cromatina ed un rilascio delle proteine prese in esame. In particolare, la riga A riporta i dati dei neutrofili non trattati ed è possibile vedere come sia MPO che CitH3 siano compartimentalizzati nel citoplasma, si inizia invece ad apprezzare un rilascio di NETs dopo 2 ore di trattamento (riga B) fino ad arrivare ad una tempistica di 4 ore (riga E) dove è possibile osservare una completa formazione di NETs.

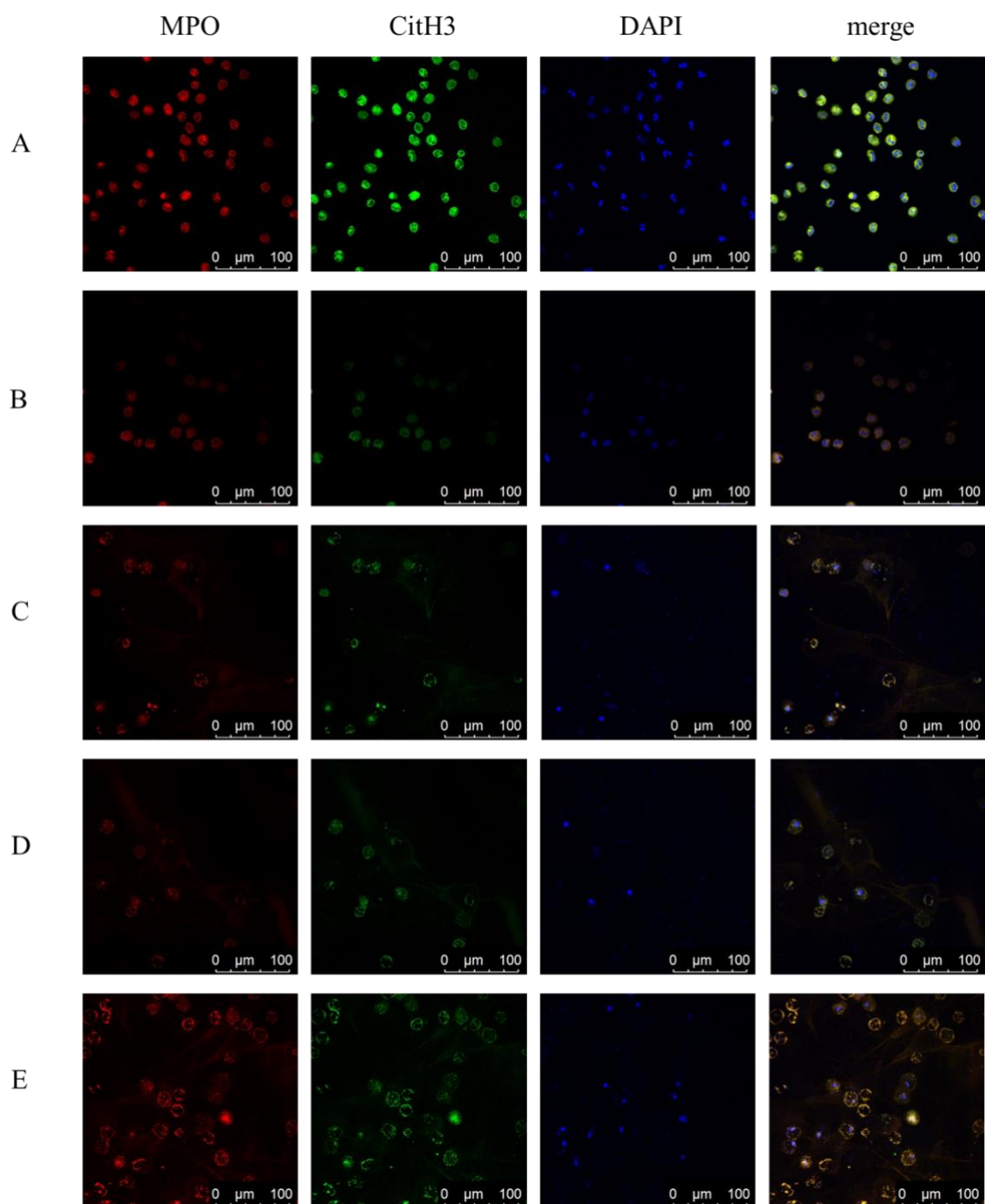


Figura 15 Rilascio di NETs dopo indizione mediata da PMA.

In rosso MPO, in verde CitH3, in blu DAPI e infine merge dei canali. Riga A: neutrofili non trattati. Riga B: neutrofili trattati per 1h con PMA 100 nM. Riga C: neutrofili trattati per 2h con PMA 100 nM. Riga D: neutrofili trattati per 3h con PMA 100 nM. Riga E: neutrofili trattati per 4h con PMA 100 nM.

Lo stesso esperimento è stato condotto investigando la presenza sulle NETs dell'enzima ARG-1 e MMP-9 e riportato in *Figura 16*. Anche in questo caso è possibile osservare confrontando i risultati ottenuti per i neutrofili non trattati (Riga A) con i neutrofili stimolati (Riga B, C e D) una rilocalizzazione degli enzimi che diventa più marcata all'aumentare del tempo di esposizione.

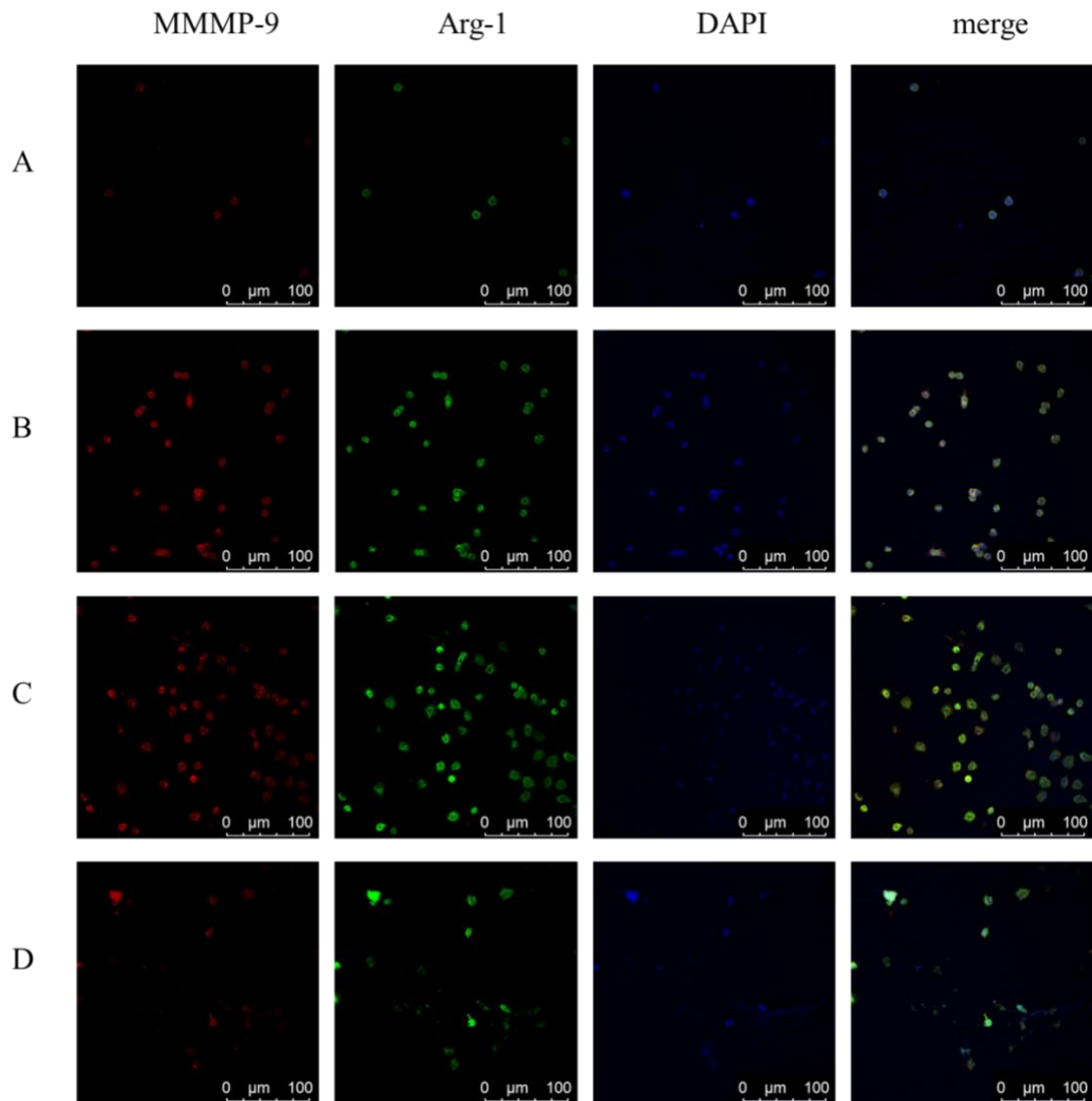


Figura 16 Valutazione della presenza sulle NETs di ARG1 ed MMP-9.

In rosso MMP-9, in verde ARG-1, in blu DAPI e infine merge dei canali. Riga A: neutrofili non trattati. Riga B: neutrofili trattati per 2h con PMA 100 nM. Riga C: neutrofili trattati per 3h con PMA 100 nM. Riga D: neutrofili trattati per 4h con PMA 100 nM.

Un ultimo esperimento è stato condotto per valutare se i neutrofili in co-cultura con le diverse linee cellulari prese in esame fossero in grado di rilasciare NETs. Una prima difficoltà riscontrata per questo esperimento è stata la sedimentazione di neutrofili su vetrino, essendo questi già ricoperti dalle cellule tumorali. Per questo motivo i neutrofili sono stati seminati in rapporto 2:1 e i dati riportati in *Figura 17*.

I risultati ottenuti non mostrano un effettivo rilascio di NETs, tuttavia, in co-cultura con la linea PaCa-44 è possibile apprezzare una riorganizzazione di MPO e CitH3 a suggerire che stia avvenendo un processo di degranulazione. Un dato interessante è invece stato osservato per i neutrofili in co-cultura con la linea PT-45 dove si vede una organizzazione in cluster.

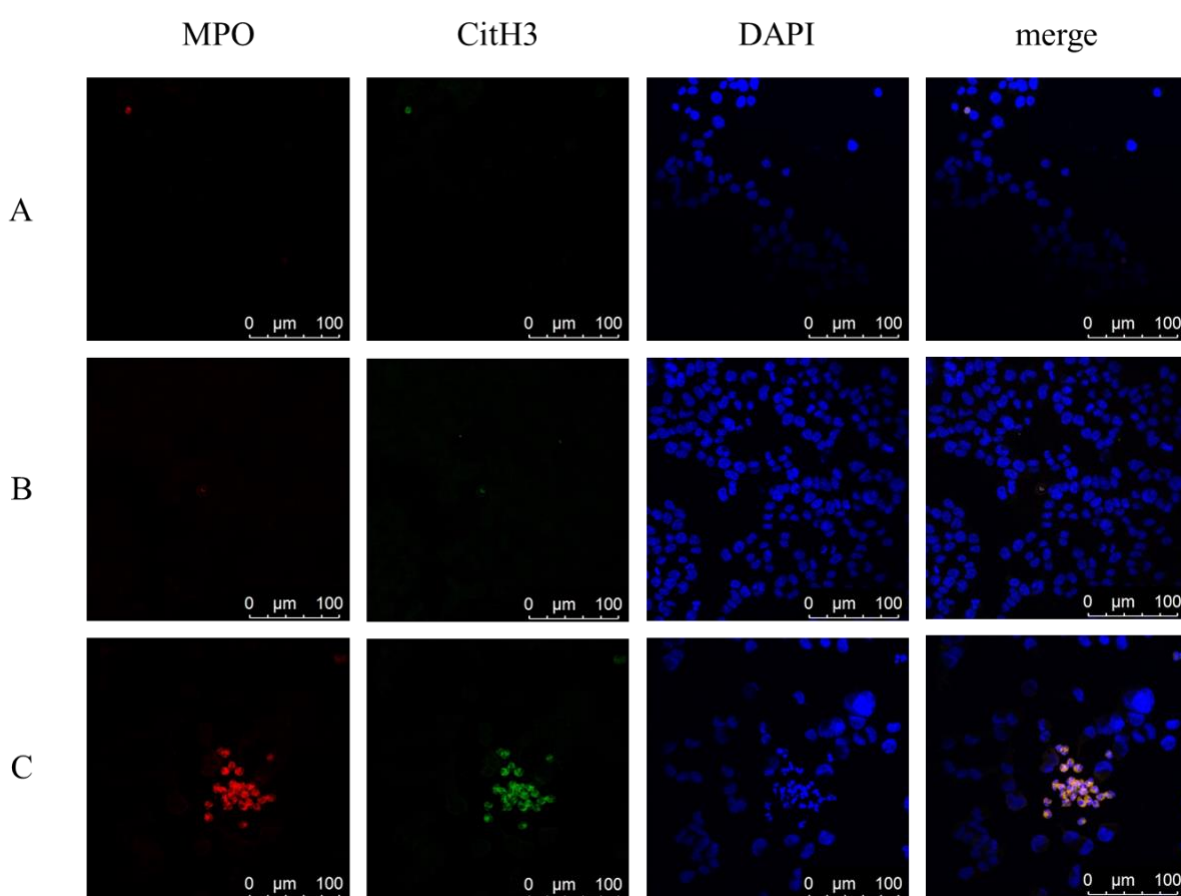


Figura 17 Stimolazione del rilascio di NETs per i neutrofili in co-cultura o condizionati con le linee di PDAC. In rosso MMP-9, in verde ARG-1, in blu DAPI e infine merge dei canali. Riga A: co-cultura neutrofili-DAN-G. Riga B: co-cultura neutrofili-PaCa 44. Riga C: co-cultura neutrofili-PT 45.

5 Conclusione e Sviluppi Futuri

Il lavoro di tesi ha confermato il ruolo attivo delle cellule tumorali nel rimodellamento del microambiente tumorale. In particolare, i dati ottenuti dimostrano che tutte e tre le linee cellulari di PDAC sono in grado di reclutare neutrofili attraverso il rilascio di IL-8.

Una volta infiltrati nel TME, i neutrofili possono andare incontro a uno switch fenotipico; l'aumento dell'espressione di ARG-1 e MMP-9, osservato soprattutto dopo 16 ore di stimolazione, suggerisce che le cellule tumorali pancreatiche siano capaci di indurre una polarizzazione in senso pro-tumorale.

In particolare, la linea DAN-G si è dimostrata la più efficace sia nel reclutare i neutrofili, mediante il rilascio di elevati livelli di IL-8, sia nell'indurne il cambiamento funzionale.

I risultati indicano inoltre che il contatto diretto cellula-cellula rappresenta un elemento fondamentale per potenziare in maniera significativa l'espressione di proteine pro-tumorigeniche; tuttavia, anche i fattori solubili rilasciati dalle cellule tumorali risultano sufficienti a determinare una modulazione significativa del fenotipo neutrofilico.

I dati finora ottenuti non consentono di definire in modo completo il fenotipo dei neutrofili. Sarà pertanto necessario, in futuro, condurre ulteriori esperimenti per caratterizzare i fattori rilasciati nel medium e verificare se i neutrofili risultino effettivamente polarizzati verso un fenotipo N2, ad esempio valutando la loro capacità di inibire l'attivazione dei linfociti T.

Infine, sarà necessario ottimizzare il protocollo per la visualizzazione delle NETs nei neutrofili in co-coltura e condizionati dalle cellule tumorali, al fine di approfondire il possibile coinvolgimento di questo meccanismo nella progressione tumorale.

6 Bibliografia

1. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* [Internet]. 2022 Apr 7;163(2):386-402.e1. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
2. Jamal MH, Khan MN. Developments in pancreatic cancer emerging therapies, diagnostic methods, and epidemiology. *Pathology - Research and Practice* [Internet]. 2025 May 22;271:156012. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2025.156012>
3. He R, Jiang W, Wang C, Li X, Zhou W. Global burden of pancreatic cancer attributable to metabolic risks from 1990 to 2019, with projections of mortality to 2030. *BMC Public Health* [Internet]. 2024 Feb 13;24(1):456. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12889-024-17875-6>
4. Stoop TF, Javed AA, Oba A, Koerkamp BG, Seufferlein T, Wilmink JW, et al. Pancreatic cancer. *The Lancet* [Internet]. 2025 Apr 1;405(10485):1182–202. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(25\)00261-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(25)00261-2)
5. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM), Fondazione AIOM, Osservatorio Nazionale Screening (ONS), PASSI, Società Italiana Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica – Divisione Italiana International Academy of Pathology (SIAPeC-IAP). *I numeri del cancro in Italia 2024* [Internet]. Milano: AIOM; 2025 [cited 2026 Feb 16]. Available from: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2025/11/2024_NDC-web-21.11.25.pdf
6. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2021 Jul 19;27(27):4298–321. Available from: <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i27.4298>
7. Zheng C, Wang J, Wang J, Zhang Q, Liang T. Cell of Origin of Pancreatic cancer. *Pancreas* [Internet]. 2024 Jan 26;53(3):e288–97. Available from: <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000002301>
8. Pedro BA, Wood LD. Early neoplastic lesions of the pancreas: initiation, progression, and opportunities for precancer interception. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2025 Jul 14;135(14). Available from: <https://doi.org/10.1172/jci191937>
9. Pflüger MJ, Brosens LAA, Hruban RH. Precursor lesions in familial and hereditary pancreatic cancer. *Familial Cancer* [Internet]. 2024 Feb 6;23(3):267–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-024-00359-2>

10. Ikezawa K, Urabe M, Kai Y, Takada R, Akita H, Nagata S, et al. Comprehensive review of pancreatic acinar cell carcinoma: epidemiology, diagnosis, molecular features and treatment. *Japanese Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2023 Dec 18;54(3):271–81. Available from: <https://doi.org/10.1093/jjco/hyad176>
11. Bien E, Roganovic J, Krawczyk MA, Godzinski J, Orbach D, Cecchetto G, et al. Pancreatoblastoma in children: EXPeRT/PARTNER diagnostic and therapeutic recommendations. *Pediatric Blood & Cancer* [Internet]. 2021 Jun 1;68(S4):e29112. Available from: <https://doi.org/10.1002/pbc.29112>
12. Cloyd JM. Non-functional neuroendocrine tumors of the pancreas: Advances in diagnosis and management. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2015 Jan 1;21(32):9512. Available from: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i32.9512>
13. Rubin SJS, Sojwal RS, Gubatan J, Rogalla S. The tumor immune microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: neither hot nor cold. *Cancers* [Internet]. 2022 Aug 31;14(17):4236. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers14174236>
14. Cannon A, Thompson C, Hall BR, Jain M, Kumar S, Batra SK. Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: insight into pathological function and therapeutic potential. *Genes & Cancer* [Internet]. 2018 May 21;9(3–4):78–86. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6086006/>
15. Pa-C SK, Anp-Bc AE, Pa-C JG, Anp-Bc AJ, Uoro I, Aocnp EBAB. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Characteristics of tumor microenvironment and barriers to treatment. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* [Internet]. 2020 Sep 1;11(7):693–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33575066/>
16. Wu B, Zhang B, Li B, Wu H, Jiang M. Cold and hot tumors: from molecular mechanisms to targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [Internet]. 2024 Oct 18;9(1):274. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01979-x>
17. Liu YT, Wang YL, Wang S, Li JJ, He W, Fan XJ, et al. Turning cold tumors into hot tumors to ignite immunotherapy. *Molecular Cancer* [Internet]. 2025 Oct 14;24(1):254. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02477-6>
18. Ullman NA, Burchard PR, Dunne RF, Linehan DC. Immunologic strategies in pancreatic Cancer: Making cold tumors hot. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2022 Jul 15;40(24):2789–805. Available from: <https://doi.org/10.1200/jco.21.02616>

19. Wang J, Yang J, Narang A, He J, Wolfgang C, Li K, et al. Consensus, debate, and prospective on pancreatic cancer treatments. *Journal of Hematology & Oncology* [Internet]. 2024 Oct 10;17(1):92. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01613-x>

20. Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment* [Internet]. 2020 Jan 1;19:1533033820962117. Available from: <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>

21. Zou Y, Gao S, Yu X, Zhou T, Xie Y, Guo X, et al. Survival outcomes of neoadjuvant therapy followed by radical resection versus upfront surgery for stage I–III pancreatic ductal adenocarcinoma: a retrospective cohort study. *International Journal of Surgery* [Internet]. 2023 May 3;109(6):1573–83. Available from: <https://doi.org/10.1097/js9.0000000000000425>

22. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2013 Oct 16;369(18):1691–703. Available from: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1304369>

23. Liaki V, Barrambana S, Kostopoulou M, Lechuga CG, Zamorano-Dominguez E, Acosta D, et al. A targeted combination therapy achieves effective pancreatic cancer regression and prevents tumor resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2025 Dec 2;122(49):e2523039122. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.2523039122>

24. Ju Y, Xu D, Liao MM, Sun Y, Bao WD, Yao F, et al. Barriers and opportunities in pancreatic cancer immunotherapy. *Npj Precision Oncology* [Internet]. 2024 Sep 12;8(1):199. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00681-z>

25. Mbbs AKA, Lichtman AH MD PhD, Mbbs SP PhD. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier; 2021.

26. Obeagu EI. Tumor immunology: unraveling the complex interaction between tumors and the immune system: a narrative review. *Annals of Medicine and Surgery* [Internet]. 2025 Aug 12;87(10):6551–63. Available from: <https://doi.org/10.1097/ms9.00000000000003719>

27. Oli AN, Adejumo SA, Rowaiye AB, Ogidigo JO, Hampton-Marcell J, Ibeanu GC. Tumour Immunotherapy and Applications of Immunological Products: A Review of literature.

- Journal of Immunology Research [Internet]. 2024 Jan 1;2024(1):8481761. Available from: <https://doi.org/10.1155/2024/8481761>
28. Gubin MM, Vesely MD. Cancer immunoediting in the era of immuno-oncology. Clinical Cancer Research [Internet]. 2022 May 20;28(18):3917–28. Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-1804>
 29. Tsai CH, Chuang YM, Li X, Yu YR, Tzeng SF, Teoh ST, et al. Immunoediting instructs tumor metabolic reprogramming to support immune evasion. Cell Metabolism [Internet]. 2023 Jan 1;35(1):118-133.e7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.12.003>
 30. Zhang H, Li S, Wang D, Liu S, Xiao T, Gu W, et al. Metabolic reprogramming and immune evasion: the interplay in the tumor microenvironment. Biomarker Research [Internet]. 2024 Sep 3;12(1):96. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00646-1>
 31. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell [Internet]. 2010 Mar 1;140(6):883–99. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
 32. Nishida A, Andoh A. The role of inflammation in cancer: Mechanisms of tumor initiation, progression, and metastasis. Cells [Internet]. 2025 Mar 25;14(7):488. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells14070488>
 33. De Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. Cancer Cell [Internet]. 2023 Mar 1;41(3):374–403. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
 34. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. Signal Transduction and Targeted Therapy [Internet]. 2021 Jul 12;6(1):263. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>
 35. Nishida A, Andoh A. The role of inflammation in cancer: Mechanisms of tumor initiation, progression, and metastasis. Cells [Internet]. 2025 Mar 25;14(7):488. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells14070488>
 36. Labbozzetta M, Notarbartolo M, Poma P. Can NF-KB be considered a valid drug target in neoplastic diseases? Our point of view. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2020 Apr 27;21(9):3070. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21093070>

37. Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, et al. Inflammation-Induced tumorigenesis and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 May 21;22(11):5421. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22115421>

38. Zhang N, Ng AS, Cai S, Li Q, Yang L, Kerr D. Novel therapeutic strategies: targeting epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer. *The Lancet Oncology* [Internet]. 2021 Jul 30;22(8):e358–68. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00343-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00343-0)

39. Tsioumpekou M, Krijgsman D, Leusen JHW, Olofsen PA. The role of cytokines in neutrophil development, tissue homing, function and plasticity in health and disease. *Cells* [Internet]. 2023 Jul 31;12(15):1981. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells12151981>

40. Carnevale S, Di Ceglie I, Grieco G, Rigatelli A, Bonavita E, Jaillon S. Neutrophil diversity in inflammation and cancer. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2023 Apr 26;14:1180810. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1180810>

41. Mehta HM, Corey SJ. G-CSF, the guardian of granulopoiesis. *Seminars in Immunology* [Internet]. 2021 Apr 1;54:101515. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101515>

42. Pratt HG, Steinberger KJ, Mihalik NE, Ott S, Whalley T, Szomolay B, et al. Macrophage and neutrophil interactions in the pancreatic tumor microenvironment drive the pathogenesis of pancreatic cancer. *Cancers* [Internet]. 2021 Dec 31;14(1):194. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers14010194>

43. Geismann C, Schäfer H, Gundlach JP, Hauser C, Egberts JH, Schneider G, et al. NF-KB dependent chemokine signaling in pancreatic cancer. *Cancers* [Internet]. 2019 Sep 26;11(10):1445. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers11101445>

44. Zhang Q, Cao Z, Yan S, Chen B, Wu H, Cao H, et al. Metabolic and immune crosstalk between cancer-associated fibroblasts and pancreatic cancer cells. *Journal of Translational Medicine* [Internet]. 2025 Oct 17;23(1):1118. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-025-07164-0>

45. Jiang W, Li X, Xiang C, Zhou W. Neutrophils in pancreatic cancer: Potential therapeutic targets. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2022 Oct 17;12:1025805. Available from: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1025805>
46. Huber M, Brehm CU, Gress TM, Buchholz M, Alhamwe BA, Von Strandmann E, et al. The immune microenvironment in pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 Oct 3;21(19):7307. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21197307>
47. Zhong J, Zong S, Wang J, Feng M, Wang J, Zhang H, et al. Role of neutrophils on cancer cells and other immune cells in the tumor microenvironment. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet]. 2023 May 17;1870(7):119493. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119493>
48. Jin W, Xu HX, Zhang SR, Li H, Wang WQ, Gao HL, et al. Tumor-Infiltrating NETs Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology* [Internet]. 2018 Oct 29;26(2):635–43. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6941-4>
49. Kajioka H, Kagawa S, Ito A, Yoshimoto M, Sakamoto S, Kikuchi S, et al. Targeting neutrophil extracellular traps with thrombomodulin prevents pancreatic cancer metastasis. *Cancer Letters* [Internet]. 2020 Oct 13;497:1–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.015>
50. Zhang J, Gu J, Wang X, Ji C, Yu D, Wang M, et al. Engineering and targeting neutrophils for cancer therapy. *Advanced Materials* [Internet]. 2024 Feb 7;36(19):e2310318. Available from: <https://doi.org/10.1002/adma.202310318>
51. Wang L, Liu Y, Dai Y, Tang X, Yin T, Wang C, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals BHLHE40-driven pro-tumour neutrophils with hyperactivated glycolysis in pancreatic tumour microenvironment. *Gut* [Internet]. 2022 Jun 10;72(5):958–71. Available from: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326070>
52. Lekan AA, Weiner LM. The role of chemokines in orchestrating the immune response to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers* [Internet]. 2024 Jan 28;16(3):559. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers16030559>

53. Menjivar RE, Nwosu ZC, Du W, Donahue KL, Hong HS, Espinoza C, et al. Arginase 1 is a key driver of immune suppression in pancreatic cancer. *eLife* [Internet]. 2023 Feb 2;12. Available from: <https://doi.org/10.7554/elife.80721>