



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

**PLASTICITÀ FUNZIONALE DEI NEUTROFILI:
STUDIO “IN VITRO” CON MODELLI 3D DI
CELLULE TUMORALI**

Relatore

Dott.ssa Silvia FALLARINI

Candidato

Federica NEBULONI

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2022/2023

Alla mia famiglia, con immensa gratitudine

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ADCC: citotossicità cellulare anticorpo dipendente

APC: cellula presentante l'antigene

ARG-1: arginasi 1

BSA: albumina sierica bovina

CTC: cellule tumorali circolanti

CTL: linfocita T citotossico

DAMP: patterns molecolari associati al danno

DC: cellula dendritica

ECM: matrice extracellulare

EMT: transizione epitelio mesenchimale

eNAMPT: extracellulare nicotinammide fosforibosiltransferasi

FBS: siero fetale bovino

Fc: frammento cristallizzabile

G-CSF: fattore stimolante colonie di granulociti

GM-CSF: fattore stimolante colonie di granulociti-macrofagi

GMP: progenitori granulociti-monociti

HDN: neutrofili ad alta densità

HIV-1: virus dell'immunodeficienza umana

HSC: cellula staminale ematopoietica

ICAM 1/2: molecola di adesione intercellulare 1/2

IFN: interferone

Ig: immunoglobulina

IL: interleuchina

LFA-1: antigene 1 associato alla funzione linfocitaria

LDN: neutrofili a bassa densità

LPMP: progenitore multipotente linfoide

MDSC: cellule soppressorie di derivazione mieloide

MMP-2/MMP-9: metalloproteinasi della matrice

MPO: mieloperossidasi

MPP: cellula progenitrice multipotente

NDN: neutrofili a densità normale

NE: elastasi neutrofila

NET: trappole extracellulari dei neutrofili

NF- κ B: fattore di trascrizione nucleare

NK: cellula natural killer

PAMP: profili molecolari associati ai patogeni

PAD4: peptidil arginina deaminasi 4

PD-1/L1: proteina 1 della morte cellulare programmata/ligando

PMN: polimorfonucleati

PRR: recettori dell'immunità innata

ROS: specie reattiva dell'ossigeno

RNS: specie reattiva dell'azoto

TAM: macrofagi associati al tumore

TAN: neutrofili associati al tumore

TBS: tampone tris salino

TGF- β : fattore di crescita trasformante β

TME: microambiente tumorale

TNF: fattore di necrosi tumorale

Treg: cellula T regolatoria

VEGF: fattore di crescita dell'endotelio vascolare

INDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO..... | 3 |
| 1.1.1 CARATTERISTICHE DEL SISTEMA IMMUNITARIO..... | 4 |
| 1.1.2 IMMUNITÀ INNATA E IMMUNITÀ ADATTATIVA | 5 |
| 1.2 IL CANCRO E STATISTICHE CORRELATE | 7 |
| 1.2.1 LA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA | 8 |
| 1.2.2 IMMUNITÀ ANTITUMORALE | 10 |
| 1.2.3 IMMUNOEDITING DEI TUMORI | 11 |
| 1.3 SVILUPPO DEI NEUTROFILI E DIAPEDESI | 13 |
| 1.3.1 PATHWAYS DI ATTIVAZIONE NEUTROFILA DURANTE LE INFEZIONI | 16 |
| 1.4 I NEUTROFILI NEL MICROAMBIENTE TUMORALE | 18 |
| 1.5 IL DUPLICE RUOLO SVOLTO DAI TAN | 19 |
| 1.6 NEUTROFILI E METASTASI..... | 21 |
| 2. SCOPO DEL LAVORO | 25 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 29 |
| 3.1 ISOLAMENTO DEI NEUTROFILI..... | 31 |
| 3.2 ANALISI MORFOLOGICA DEI NEUTROFILI..... | 32 |
| 3.3 COLTURE CELLULARI | 32 |
| 3.4 SVILUPPO DI SFEROIDI MULTI CELLULARI | 34 |
| 3.5 CO-COLTURE: SFEROIDI E NEUTROFILI..... | 35 |
| 3.6 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER WESTERN BLOT | 35 |
| 3.7 WESTERN BLOT | 36 |
| 3.8 ANALISI STATISTICHE | 37 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 39 |
| 4.1 LO STUDIO DEI TAN | 41 |
| 4.2 L'ESPRESSIONE DI MARCATORI TIPICI UP-REGOLATI IN CONTESTO TUMORALE | 42 |
| 4.2.1 MMP-9 | 43 |
| 4.2.2 NE | 49 |
| 4.2.3 ARG-1 | 53 |
| 4.2.4 eNAMPT | 56 |
| 5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI..... | 64 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 68 |
| 7. RINGRAZIAMENTI..... | 77 |

1. INTRODUZIONE

1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO

Lo scopo fondamentale dell'immunità è che nessuna parte del nostro corpo venga esclusa dalla sua sorveglianza. Proprio per questo il sistema immunitario (SI) gioca un ruolo cruciale nella nostra difesa, consumando enormi risorse e producendo un gran numero di cellule da cui dipende il suo corretto funzionamento. La maggior parte delle cellule immunitarie sono prodotte dal midollo osseo e dopo la prima infanzia alcune di queste divengono specializzate prima di essere rilasciate a pattugliare l'organismo, altre invece completeranno il processo di maturazione una volta incontrato il proprio antigene specifico. Affrontare le infezioni è compito di diverse famiglie di globuli bianchi (Figura 1); ad innescare la risposta sono coinvolte le cellule del sistema immunitario innato, neutrofili e macrofagi, che sono i primi a giungere nel luogo dove è presente l'insulto. I patogeni che non vengono eliminati in questo intervento passano al vaglio dei linfociti, cellule che espletano le funzioni di adattamento e di memoria consentendo al sistema immunitario di dare risposte sempre più specifiche e di memorizzare i diversi antigeni, così da debellare l'infezione primaria e poter contrastare quelle future.

| White blood cell | | Functions |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Neutrophils |  | Early responder, phagocytosis and local killing |
| Lymphocytes |  | Adaptive immunity, sub-divided into T-cells and B-cells |
| Monocytes |  | Early responder, phagocytosis and antigen presentation. Mature as macrophages in the tissue. |
| Basophils and eosinophils | Granulocytes, rare in the circulation | Bind IgE, defence against parasites, allergy |

FIGURA 1. Globuli bianchi analizzati con esami del sangue di routine. I neutrofili e i macrofagi rispondono rapidamente all'infezione locale; i linfociti coordinano la risposta adattativa [1].

1.1.1 CARATTERISTICHE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

I sistemi immunitari hanno un rapporto critico con l'ambiente, perché nella maggior parte dei casi l'incontro con qualcosa di esterno risulta innocuo per loro, ma quelle poche volte in cui non lo è, può essere davvero pericoloso. Un efficace sistema immunitario deve essere in grado di discriminare tali contesti. Questa significativa adattabilità sottolinea il fatto che il sistema immunitario interroga gli elementi fondamentali dell'ambiente, dove tutto ciò che non è riconosciuto può rappresentare una minaccia per l'organismo. L'abilità del sistema immunitario ad adattarsi in modo flessibile ai cambiamenti dell'ambiente esterno è cruciale nel contrastare le infezioni ed il cancro; questo perché ogni volta che una cellula si divide, vi è una remota possibilità che possa sviluppare una mutazione casuale, imprevedibile ma significativa nella trasformazione neoplastica. Le infezioni progrediscono molto più rapidamente rispetto al ciclo replicativo dei loro ospiti e possono cambiare espressione per sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immunitario, per questo motivo un'immunità efficace deve far fronte a questa imprevedibilità. Affinché si sviluppi un'infezione microbica, l'agente patogeno deve interagire con le singole cellule. La pelle e le mucose rendono difficile questo approccio ravvicinato perché le barriere fisiche forniscono una protezione innata, come i cheratinociti, cellule sovrapposte e resistenti presenti nello strato più esterno della pelle; anche le barriere chimiche, come l'ambiente acido dello stomaco, ed enzimi quale il lisozima, presente nella mucosa nasale, salivare e nelle lacrime in grado di uccidere gran parte dei batteri. Quando gli agenti patogeni riescono a penetrare queste difese rappresentano una potenziale minaccia per il nostro organismo.

Esiste un'ampia diversità nei metodi di attacco ed ingresso degli agenti patogeni e ostacolando queste vie di accesso si può evitare dal principio un'infezione. In che modo? Attraverso la produzione di anticorpi il sistema immunitario può neutralizzare un'infezione (Figura 2). Un agente patogeno oppure una cellula tumorale possono essere eliminati dal SI solo uccidendo, si tratta dunque di un'attività pericolosa che può mettere a rischio la vita stessa dell'ospite a seconda della gravità e circostanze dell'insulto [1].

| Main antibody isotype | Secreted form | | Functions |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| IgD | None | | Naive B-cell receptor |
| IgM | Pentamer |  | Naive B-cell receptor, natural antibodies, complement activation |
| IgG | Monomer |  | Opsonization , complement activation, neonatal immunity |
| IgE | Mostly bound to cells | | Defence against parasites, Allergy |
| IgA | Dimer, secreted into mucus |  | Mucosal immunity |

FIGURA 2. I cinque principali isotipi di anticorpi che giocano ruoli differenti nella risposta immunitaria [1].

1.1.2 IMMUNITÀ INNATA E IMMUNITÀ ADATTATIVA

L'immunità innata e adattativa rappresentano due strategie strettamente interconnesse implicate nella difesa dell'organismo (Figura 3). L'immunità innata, anche definita immunità nativa, è fondamentale nelle fasi iniziali dell'infezione, nel controllo e contenimento del danno; poiché si basa su meccanismi insiti e già attivi prima che subentri l'infezione, in modo da assicurare una rapida risposta. I principali costituenti dell'immunità innata sono: barriere chimiche e fisiche, cellule dendritiche (DC) che riconoscono rapidamente ed in modo efficace strutture prodotte dai patogeni (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) e molecole endogene secrete da cellule morte (*Damaged-Associated Molecular Patterns*, DAMP) grazie all'espressione di recettori per profili molecolari (PRR). Ancora, cellule fagocitiche, quali macrofagi e neutrofilo, che attraverso l'espressione di alcuni PRR e di altri recettori riconoscono ed ingeriscono i microrganismi per dare vita al fagosoma, risultato della fagocitosi, che una volta fuso con il lisosoma porta alla formazione del fagolisosoma, in cui si concentra buona parte dei meccanismi microbicidi. Altre componenti fondamentali dell'immunità innata sono i mastociti, cellule sentinella che secernono importanti citochine pro-infiammatorie come il fattore di necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), le componenti del sistema del complemento e le cellule natural killer (NK) che analogamente ai linfociti T CD8⁺ citotossici (CTL) hanno la capacità di

eliminare le cellule infettate e rilasciare IFN- γ , una citochina importante nell'attivare le funzioni microbicide dei macrofagi; questo perché la risposta primaria dell'immunità innata alle infezioni è proprio la secrezione di citochine. Tra queste troviamo il TNF, mediatore della risposta infiammatoria acuta ed è prodotto principalmente dai macrofagi tissutali e dalle DC, interleuchina-1 (IL-1) e interleuchina-6 (IL-6) anch'esse coinvolte nella risposta infiammatoria acuta e secrete da macrofagi e cellule endoteliali. Un'altra citochina significativa da menzionare è l'interleuchina-12 (IL-12), prodotta dalle DC e dai macrofagi stimola la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T e cellule NK. Inoltre, promuove la citotossicità delle cellule NK e dei linfociti T CD8.

L'immunità innata ha inoltre la capacità di attivare l'immunità adattativa o acquisita, quando la prima fase difensiva non ha avuto successo nel contrastare l'insulto.

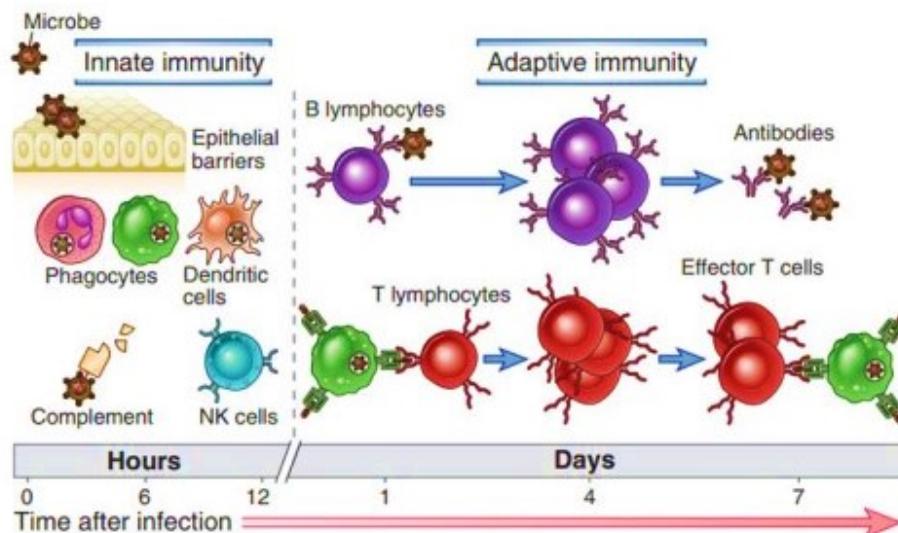


FIGURA 3. Meccanismo schematico dell'immunità innata, essenziale per fornire le difese iniziali contro le infezioni, e adattativa, la quale come si evince dall'immagine, si attiva in seguito alla risposta innata e consiste prevalentemente nell'attivazione dei linfociti [2].

Proprio per questo motivo l'immunità adattativa è considerata una fase tardiva della risposta immunitaria, ha il compito di eliminare il danno e garantire protezione a lungo termine, la cosiddetta immunizzazione. Le risposte adattative basano la loro

attività su due tipi di cellule, le sole in grado di riconoscere un antigene in modo specifico, i linfociti T e B. I quali presentano tre caratteristiche fondamentali: la diversificazione della specificità per l'antigene, funzionale alla difesa dell'ospite da tutti gli organismi patogeni presenti nell'ambiente; la memoria per permettere al sistema immunitario di ampliare la difesa nei confronti di antigeni persistenti che si incontrano nell'ambiente, ed infine la tolleranza verso il self per evitare una reattività immunologica che può sfociare in patologie autoimmuni. La risposta immunitaria adattativa si serve, oltre che dei linfociti, anche di cellule presentanti l'antigene (*Antigen-Presenting Cell*, APC) specializzate nel catturare antigeni microbici per poi presentarli sulla loro superficie per il riconoscimento da parte di linfociti. La risposta dei linfociti è quella di differenziare in cellule effettrici, responsabili dell'eliminazione dell'antigene e in cellule della memoria, per esprimere un'aumentata risposta ad un futuro incontro con l'antigene. Fondamentale è distinguere due tipi di immunità adattativa, umorale e cellulo-mediata. Nell'immunità umorale i responsabili sono i linfociti B, che una volta differenziati in plasmacellule, producono anticorpi che prevengono le infezioni ed eliminano patogeni extracellulari. Ogni anticorpo lega e agisce su uno specifico antigene. Per quanto concerne l'immunità cellulo-mediata i protagonisti sono i linfociti T: helper, citotossici suppressor e le citochine da loro prodotte. I linfociti T helper CD4⁺ aiutano sia la risposta immunitaria umorale, attivando i linfociti B a produrre anticorpi, sia l'immunità innata, attivando per esempio i macrofagi per l'eliminazione di microbi. I linfociti T CD8⁺ citotossici si occupano di eliminare, tramite lisi cellulare, le cellule infette da patogeni intracellulari, eliminando così focolai di infezione. Infine, i suppressor evitano l'insorgenza di una risposta immunitaria troppo violenta, inattivando alcune cellule [2].

1.2 IL CANCRO E STATISTICHE CORRELATE

Il cancro, patologia dovuta ad alterazioni patofisiologiche del processo intrinseco di divisione cellulare, è risultato come una significativa condizione patologica responsabile di un gran numero di decessi ogni anno in tutto il mondo. Infatti, grazie alle analisi statistiche ottenute dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO), Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro

(International Agency for Research on Cancer, IARC) e da GLOBOCAN, sappiamo che più di 19.3 milioni nuovi casi di cancro vengono diagnosticati all'anno, portando al decesso circa 10 milioni di pazienti (Figura 4). Le cause del cancro sono variabili da paziente a paziente e dipendono da diversi fattori, quali inquinamento ambientale, ereditarietà, sedentarietà, una scorretta alimentazione e stress. È stata riscontrata un'insorgenza prevalente di un tipo di cancro a seconda del sesso; ad esempio, il cancro alla mammella è il più frequente diagnosticato ogni anno nella popolazione femminile a livello globale (2.26 milioni di casi), mentre quello al polmone (2.21 milioni) e alla prostata (1.41 milioni) rappresentano l'incidenza maggiore per quanto riguarda la popolazione maschile [3].

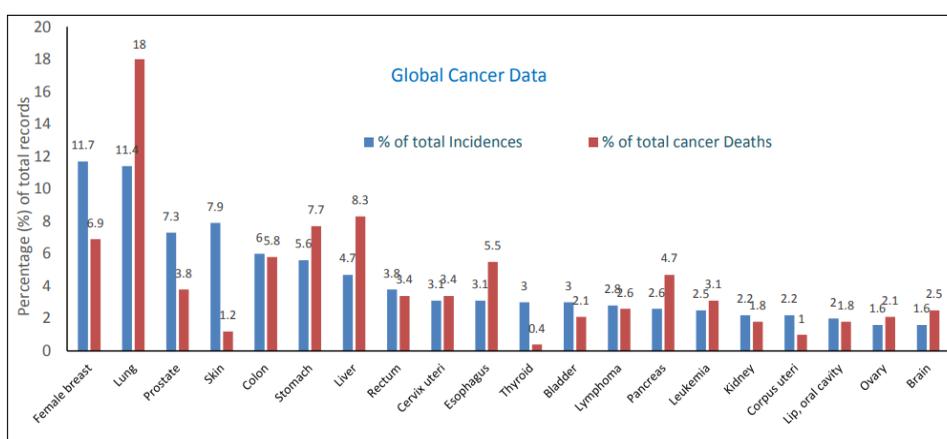


FIGURA 4. Rappresentazione in percentuale delle incidenze totali (19.3 milioni) e dei decessi totali (10 milioni) dovuti ai relativi tipi cancro [3].

1.2.1 LA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA

La cancerogenesi è un processo multifasico molto complesso di trasformazione neoplastica, in cui diversi fattori contribuiscono all'accumulo di tutte quelle mutazioni che porteranno ad un insieme di alterazioni, tradotte nella trasformazione fenotipica di una cellula normale in tumorale. L'insorgenza di una neoplasia è caratterizzata da una cascata di eventi che possono essere sintetizzati in tre tappe: inizio, promozione e diffusione. La prima fase avviene molto rapidamente ed in maniera irreversibile. Una cellula somatica (ovvero tutte le cellule dell'organismo, eccetto quelle sessuali) in partenza sana, subisce delle modifiche strutturali causate da agenti cancerogeni, i cosiddetti "iniziatori". Nel novero di

questi agenti di natura fisica troviamo per esempio i raggi UV, responsabili di tumori della cute come il melanoma, tra gli agenti di natura chimica ci sono gli agenti alchilanti, sostanze che si intercalano nelle molecole di DNA determinando alterazioni nella sua replicazione; infine, tra gli agenti di natura biologica troviamo i virus, come il Papilloma umano che una volta infettata la cellula ospite si intercala nel suo genoma, portando a danni permanenti. Tutti questi elementi danno il via alla trasformazione neoplastica. Nonostante da un punto di vista fenotipico la cellula inizialmente sia considerata ancora sana, i danni interni si sono già verificati. Nella seconda fase di promozione tumorale, più lenta della precedente, le cellule che hanno accumulato mutazioni cominciano a proliferare creando una popolazione cellulare più vasta e con un elevato rischio di sviluppare mutazioni genetiche. Un ruolo cruciale in questa fase è giocato da agenti cancerogeni definiti “promotori”, in grado di agire su cellule che hanno già acquisito mutazioni, consentendo loro di diventare cancerose. Tra questi agenti ricordiamo alcuni farmaci, l’alcol ed un elevato consumo di carboidrati e grassi saturi. La terza ed ultima fase di trasformazione neoplastica vede crescere il tumore invadendo tessuti circostanti o diffondendo attraverso il sistema linfatico, come avviene nel caso del carcinoma della mammella.

In definitiva, i tratti distintivi del cancro sono stati sintetizzati in sei caratteristiche essenziali che accomunano tutte le cellule tumorali, identificati dagli autori scientifici Douglas Hanahan e Robert Weinberg (Figura 5) [4]. Questo elenco è stato poi aggiornato nel 2011, con l’aggiunta di altre quattro caratteristiche cruciali nell’evoluzione di un tumore. Tali caratteristiche comuni sono: immortalità replicativa, proliferazione incontrollata, insensibilità ai fattori che bloccano la crescita cellulare, resistenza all’apoptosi, invasività e metastasi, promozione dell’angiogenesi, riprogrammazione del metabolismo energetico in quanto una cellula tumorale utilizza meccanismi diversi rispetto alla cellula normale per produrre l’energia a lei necessaria. Si ricorda anche l’instabilità genomica, l’evasione dalle risposte immunitarie e l’infiammazione associata al cancro; dovuta al fatto che una cellula neoplastica è parte integrante del microambiente infiammatorio, e nel momento in

cui si scatena una reazione infiammatoria, se prolungata, cronicizza e favorisce la genesi di un tumore [5].

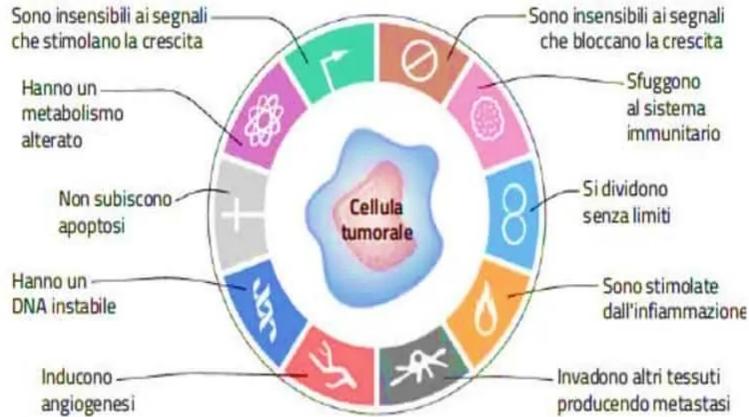


FIGURA 5. Schema aggiornato di tutte le caratteristiche comuni delle cellule tumorali [4].

1.2.2 IMMUNITÀ ANTITUMORALE

Tra le funzioni fisiologiche del sistema immunitario vi è l'immunosorveglianza, ossia l'identificazione e l'eliminazione di cloni di cellule mutate prima che queste diano origine a un tumore, e l'eradicazione degli stessi una volta formati. Spesso succede però che le risposte immunitarie non siano in grado di prevenire la genesi e progressione dei tumori, questo a causa di molteplici ragioni. In primis, molti tumori utilizzano meccanismi specifici per inibire le risposte dell'ospite ed in secondo luogo le cellule tumorali perdono l'espressione di antigeni che potrebbero venire riconosciuti dalle risposte immunitarie dell'ospite. Infine, una terza ragione per cui l'immunità antitumorale difficilmente riesce ad eradicare cellule trasformate, è la rapida progressione del tumore che può prevalere sul monitoraggio del sistema immunitario [2].

1.2.3 IMMUNOEDITING DEI TUMORI

Recentemente è stato sempre più riconosciuto che l'immunosorveglianza rappresenta solo una dimensione nella complessa relazione tra il sistema immunitario e il cancro. A tal proposito è stato evidenziato come alcune cellule tumorali siano in grado di eludere il sistema immunitario, grazie all'incremento di varianti dotate di una ridotta immunogenicità. Questo dinamico meccanismo prende il nome di immunoediting dei tumori ed è costituito da tre fasi: eliminazione, equilibrio ed evasione (Figura 6) [6].

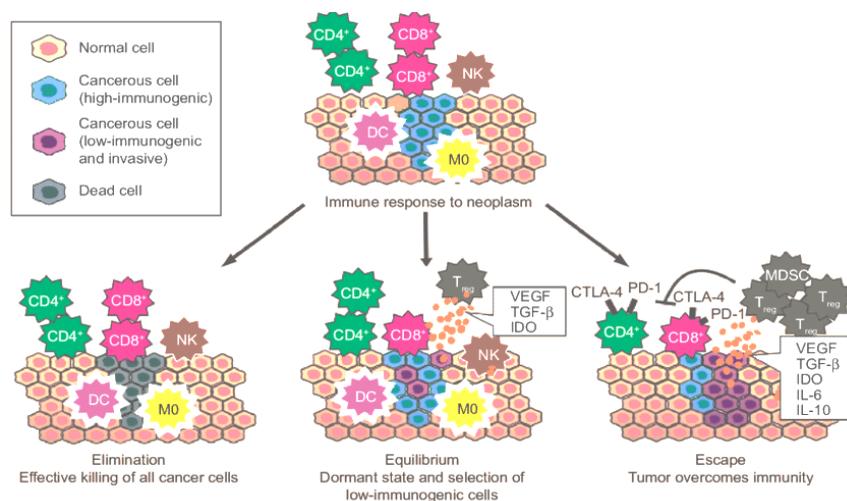


FIGURA 6. Le tre "E" dell'immunoediting tumorale [6].

Il processo di eliminazione racchiude il concetto originale di immunosorveglianza esposto nel paragrafo precedente. In questa prima fase di eliminazione, una volta che i tumori solidi raggiungono una certa dimensione, iniziano a crescere in modo invasivo e necessitano di un maggiore apporto di sangue che deriva dalla produzione di proteine angiogeniche. La crescita invasiva provoca piccole lesioni nel tessuto circostante, inducendo segnali infiammatori che portano al reclutamento di cellule del sistema immunitario innato, quali cellule NK, macrofagi e cellule dendritiche. Le strutture presenti sulle cellule trasformate (come risultato del processo di trasformazione stesso o indotte dalla risposta infiammatoria in corso ma limitata) sono riconosciute dai linfociti infiltranti, come le cellule NK che sono stimulate a produrre IFN- γ , il quale può indurre morte cellulare attraverso meccanismi antiproliferativi, apoptotici e la produzione delle chemochine

CXCL10, CXCL9 e CXCL11 dalle cellule tumorali stesse e dai tessuti normali circostanti. Queste chemochine sono in grado di arrestare l'angiogenesi, inibendo così la progressione tumorale, e di reclutare altre cellule infiammatorie come NK e macrofagi. Nella fase finale di eliminazione, le cellule NK e i macrofagi che si infiltrano nel tumore, producono IFN- γ e IL-12, attivandosi a vicenda, portando ad un'ulteriore necrosi di cellule tumorali; attraverso meccanismi che coinvolgono il ligando di induzione dell'apoptosi legato al fattore di necrosi tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNF- α), la perforina, gli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS). Nel linfonodo drenante, le cellule dendritiche appena immigrate inducono il reclutamento di cellule T helper CD4+ e CD8+ specifiche per il tumore, le quali arrivano nella sede tumorale, dove distruggono le restanti cellule maligne portatrici di antigene.

Nella fase di equilibrio qualsiasi variante di cellula tumorale sopravvissuta al processo di eliminazione entra in un equilibrio dinamico, nel quale linfociti T, IL-12 e IFN- γ esercitano una potente pressione, sufficiente a contenere, ma non ad estinguere completamente, le rimanenti cellule maligne.

Nella fase di evasione, le cellule tumorali che sono diventate insensibili ai meccanismi di screening immunologico, iniziano ad espandersi e a replicarsi in maniera incontrollata. Se questo processo non viene rallentato o arrestato può portare in breve tempo ad una prognosi infausta del paziente [7]. Tra i molteplici meccanismi che consentono alle cellule tumorali di eludere la risposta del sistema immunitario dell'ospite troviamo prodotti di secrezione delle cellule tumorali che hanno un'azione immunosoppressiva, come il TGF- β , citochina inibente le funzioni effettrici dei macrofagi e linfociti, il fattore di crescita endoteliale (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) responsabile nel promuovere l'angiogenesi e le metalloproteasi (MMP2 e MMP9) che generano nuovi siti di legame per recettori di cellule tumorali, i quali stimolano la migrazione. Infine, un ruolo cruciale nella promozione dello sviluppo neoplastico è giocato dalle componenti dell'immunità innata, quali macrofagi M2, il fattore trascrizionale NF- κ B e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC). Questi precursori mieloidi immaturi si accumulano nel sangue, nei tessuti linfoidei e nel tumore dove sopprimono le risposte antitumorali innate e dei linfociti T [2].

1.3 SVILUPPO DEI NEUTROFILI E DIAPEDESI

I granulociti, anche definiti leucociti polimorfonucleati, comprendono tre diverse popolazioni: granulociti basofili, eosinofili e neutrofili. Quest'ultimi rappresentano la più abbondante popolazione leucocitaria circolante nel sangue, circa il 50-70%. Prendono origine nel midollo osseo, da una cellula progenitrice, dopo di che entrano nel torrente circolatorio dove hanno un'emivita breve, corrispondente a 5-10 ore; mentre nei tessuti possono sopravvivere fino ad un massimo di 5 giorni. La funzione principale dei neutrofili è volta all'eliminazione di patogeni attraverso molteplici meccanismi che mettono in atto, quali fagocitosi, degranulazione e netosi (Neutrophil Extracellular Traps, NET). La granulopoiesi avviene nel midollo osseo ed è regolata dalla produzione del fattore di crescita granulocitario (Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF). Nella prima fase, una cellula staminale ematopoietica (HSC) auto-rinnovante si differenzia in una cellula progenitrice multipotente (MPP). Successivamente, le MPP si differenziano in progenitori multipotenti linfoidi (LPMP), per dare origine a progenitori granulociti-monociti (GMP). Le cellule GMP si trasformano in mieloblasti e attraversano un processo di maturazione che comprende promielociti, mielociti, metamielociti, e cellule a banda (Figura 7). Durante lo stadio promielocita la cellula si ingrandisce e appaiono i granuli primari nel citoplasma. La divisione cellulare si arresta durante la fase mielocitaria e nel citoplasma compaiono granuli specifici. Negli stadi terminali della differenziazione la dimensione del neutrofilo si riduce e le modifiche nella morfologia nucleare diventano più marcate. Allo stadio di metamielocita il nucleo comincia a rientrare, assumendo una forma a ferro di cavallo per diventare a banda nei neutrofili maturi [8].

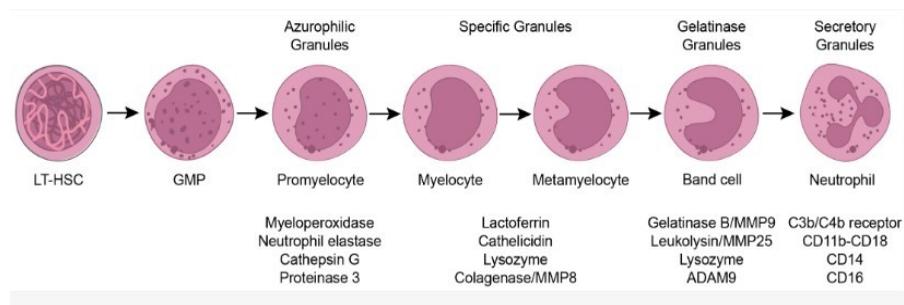


FIGURA 7. Rappresentazione della genesi dei neutrofili nel midollo osseo. Le cellule staminali ematopoietiche danno origine a neutrofili maturi tramite un processo evolutivo: cellule staminali (LT-HSC), progenitrici (GMP), promielociti, mielociti, metamielociti e cellule a banda [10].

Nel sangue periferico di individui sani si trovano esclusivamente neutrofili con nuclei bandati, anche definiti segmentati. Il loro rilascio dal midollo osseo al sangue è finemente regolato dall'equilibrio di due recettori chemochinici: CXCR4 e CXCR2. Allo stato stazionario, le cellule stromali del midollo esprimono costitutivamente la chemochina CXCL12 che fornisce un segnale di ritenzione importante per i neutrofili nel midollo osseo, grazie al suo recettore CXCR4. Invece durante il processo di maturazione, la downregulation di CXCR4 sulla superficie dei neutrofili e quindi l'attivazione di CXCR2, mediano la migrazione dei neutrofili nel torrente circolatorio [9].

I neutrofili sono le prime cellule della risposta immunitaria ad essere reclutate nel sito in cui è presente l'insulto. L'extravasazione leucocitaria o diapedesi, avviene attraverso i vasi sanguigni in risposta a mediatori dell'infiammazione e comprende diverse fasi, quali: l'adesione alla superficie endoteliale, la migrazione intravascolare, lo stravasato ed infine la migrazione nel tessuto di interesse (Figura 8).

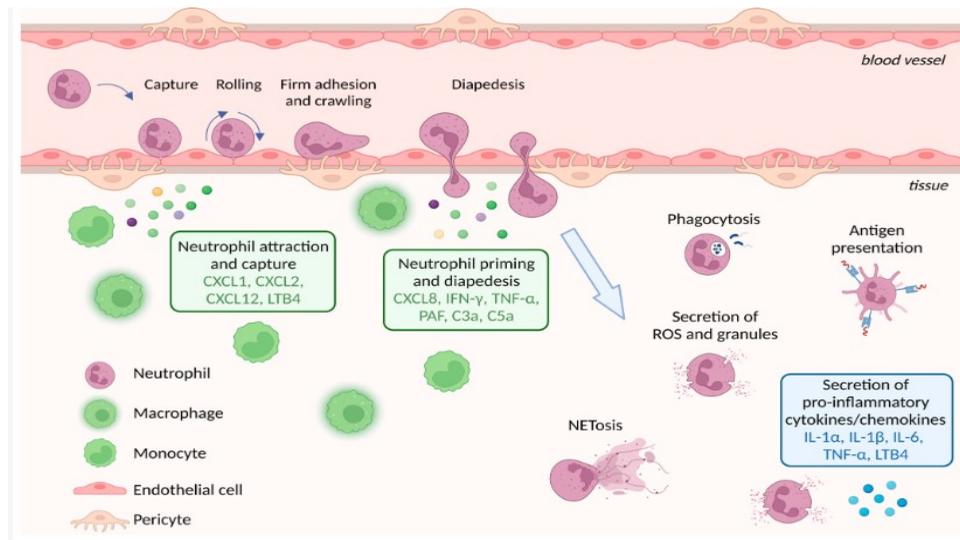


FIGURA 8. Extravasazione dei neutrofili. Le chemochine prodotte dai macrofagi e i monociti attirano i neutrofili sulla parete del vaso e mediano la cattura, il rotolamento, l'adesione e la diapedesi nel tessuto interessato, dove possono, ad esempio, fare NETosi e fagocitosi al fine di eliminare l'insulto [10].

I leucociti e le cellule endoteliali sono attivati da citochine infiammatorie, $TNF-\alpha$, $IL-1$, $INF-\gamma$ e $IL-8$, per aumentare l'espressione superficiale delle molecole di adesione ICAM-1 e ICAM-2. La prima fase dell'adesione leucocita-cellula endoteliale comporta il rotolamento del leucocita lungo la superficie dell'endotelio, un'interazione a bassa affinità mediata dalle selectine. La seconda fase richiede l'attivazione del leucocita legato, un processo mediato da chemochine, come CXCL8 e il suo specifico recettore sulla superficie del neutrofilo. Questi mediatori aumentano l'adesività dell'integrina grazie all'incremento dell'affinità recettoriale e alla mobilitazione dell'integrina stessa dai depositi cellulari. Prende inizio così la terza fase, in cui il neutrofilo termina il rolling e aderisce saldamente all'endotelio, grazie alle interazioni tra le integrine e le molecole della superfamiglia delle immunoglobuline (Ig), ad esempio, LFA-1/ICAM-1. Durante la fase finale, ossia la migrazione transendoteliale, il neutrofilo penetra nella membrana basale grazie alle metalloproteasi e tramite le chemochine secrete nel sito di infezione diffonde nei tessuti [11]. Una volta debellati i patogeni, buona parte dei neutrofili up-regola CXCR4 e va incontro ad apoptosi, mentre i loro detriti cellulari vengono poi fagocitati dai macrofagi.

1.3.1 PATHWAYS DI ATTIVAZIONE NEUTROFILA DURANTE LE INFEZIONI

I neutrofili sono la prima linea di difesa della risposta immunitaria in grado di individuare un ampio range di ligandi espressi dai patogeni, attraverso il loro repertorio di recettori dell'immunità innata (Pattern Recognition Receptors, PRRs). I meccanismi con cui avviene l'eliminazione dei patogeni durante un'infezione sono la fagocitosi, la produzione ed il rilascio di ROS, la secrezione indiretta di citochine e chemochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6, IL-8) volta a promuovere il reclutamento e l'attivazione di altre cellule dell'immunità, il rilascio di trappole extracellulari dei neutrofili (Neutrophil Extracellular Traps, NET) o di granuli citoplasmatici contenenti sostanze microbicide [12].

La fagocitosi è un processo attivo, modulato da recettori, mediante il quale una cellula internalizza un microorganismo o una particella bersaglio. L'assorbimento di particelle mediato dalle IgG è il tipo di fagocitosi più comunemente studiato. La capacità di una cellula di eseguire fagocitosi richiede il coinvolgimento di recettori fagocitari di classe Fc, che riconoscono le IgG. Questi recettori sono presenti su granulociti, macrofagi, monociti e DC. Nei neutrofili, FcRIIa (CD32), FcRIIIb (CD16) e FcRIV sono espressi costitutivamente. L'espressione di FcRI (CD64) è indotta dalla stimolazione con G-CSF. Di questi recettori, il più importante per la fagocitosi è FcRIIa, che ha code citoplasmatiche contenenti ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). L'attivazione dei FcRIIaR comporta la fosforilazione dei residui di tirosina ITAM, da parte di chinasi della famiglia Src, che dà inizio a una cascata di segnalazione con la successione di eventi come l'innalzamento del calcio libero citosolico, l'attivazione della NADPH ossidasi e la secrezione dei granuli. Così, tramite la formazione di un fagosoma e l'innescio di questi eventi, si ha l'internalizzazione del patogeno culminante con la sua eliminazione [13]. Per quanto concerne la degranulazione, i granuli rilasciati dai neutrofili sono stati classificati in tre categorie: granuli azzurrofilo o primari, granuli specifici o secondari e granuli di gelatinasi o terziari. Esempi di proteine azzurrofile dei granuli sono la mieloperossidasi (MPO), l'elastasi neutrofila (NE) e la catepsina G; esempi di proteine specifiche sono la lattoferrina e il CD66b e di proteine gelatinose sono la metalloproteinasi di matrice 9 (MMP-9) e l'arginasi 1.

Tutti i granuli sono indispensabili per l'uccisione dei patogeni, in quanto il loro contenuto può essere rilasciato nello spazio extracellulare o fuso con i fagosomi, facilitando la distruzione del materiale fagocitato all'interno della cellula. L'azione dei granuli è inoltre supportata dalla produzione di ROS [14]. Un altro meccanismo importante per l'eliminazione dei patogeni è il rilascio di trappole extracellulari dei neutrofilo. I NET sono fibrille di cromatina nucleare rilasciate nell'ambiente extracellulare costituite da componenti nucleari (DNA, istoni) associate ad una serie di proteine provenienti da granuli primari quali MPO e NE, secondari lattoferrina e PTX3, e terziari MMP-9 e PGRP-S. Queste strutture extracellulari intrappolano batteri, funghi e HIV-1, favorendo l'interazione con le molecole effettrici ed il loro smaltimento. La formazione di NET (Figura 9) è un processo attivo e veloce chiamato "NETosi" che richiede la morte cellulare, poiché induce nei neutrofilo attivati la de-condensazione della cromatina. In seguito, la disgregazione della membrana cellulare ed infine il rilascio della cromatina da parte dei neutrofilo lisati nello spazio extracellulare. La formazione dei NET è indotta dalla via Raf-MEK-ERK, attraverso l'attivazione del complesso della NADPH ossidasi e l'up-regolazione delle proteine anti-apoptiche. Dopo la stimolazione, i neutrofilo perdono la loro tipica morfologia nucleare. La de-condensazione della cromatina è un evento essenziale e richiede la generazione di ROS, l'induzione dell'autofagia dei neutrofilo, l'aumento del numero di cellule e la citrullinazione degli istoni da parte dell'enzima peptidil arginina deaminasi 4 (PAD4), ed è stimolata da NE e MPO. Ne concerne che la carenza genetica di queste molecole, come si osserva ad esempio nei pazienti con deficit di MPO o affetti da malattia granulomatosa, determina uno sviluppo deficitario di NET, che probabilmente contribuisce ad una maggiore suscettibilità alle infezioni riscontrata in questi pazienti. I microrganismi hanno acquisito una serie di meccanismi che permettono loro di sfuggire ai NET, quindi, di aumentare la loro carica batterica o virulenza. Ad esempio, la struttura della parete cellulare di *Streptococcus pneumoniae* e *L. donovani*, risulta modificata da una D-alanilazione dell'acido lipoteico citoplasmatico e dall'espressione di un lipofosfolipide glicolipidico di superficie, per proteggerli dall'attività antimicrobica dei NET [15].

1.4 I NEUTROFILI NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

L'infiltrazione di neutrofili è un chiaro segno di infiammazione cronica e proprio il microambiente tumorale è caratterizzato da questa condizione. La polarizzazione di neutrofili associati al tumore (TAN) può influenzare il ruolo che essi possono avere nel microambiente tumorale. Nel 2009 Fridlender et.al. [16], hanno messo a punto una distinzione tra neutrofili anti-tumorali (N1) e pro-tumorali (N2), dimostrando come il fattore di crescita- β (TGF- β), citochina immunosoppressiva iper-espressa dalle cellule tumorali, sia in grado di polarizzare i neutrofili all'interno del TME verso il fenotipo pro-tumorale [17]. Tra le altre cellule immunitarie infiltranti, è importante menzionare le cellule soppressorie mieloidi (MDSC), le cellule dendritiche ed i macrofagi (TAM). Nonostante i neutrofili siano potenti cellule effettrici anti-tumorali per mezzo degli elementi citotossici ed antimicrobici riscontrabili all'interno dei loro granuli, un elevato numero di studi scientifici ha dimostrato come la presenza di neutrofili promotori di angiogenesi, nel TME, sia correlata ad una prognosi sfavorevole per il paziente [18].

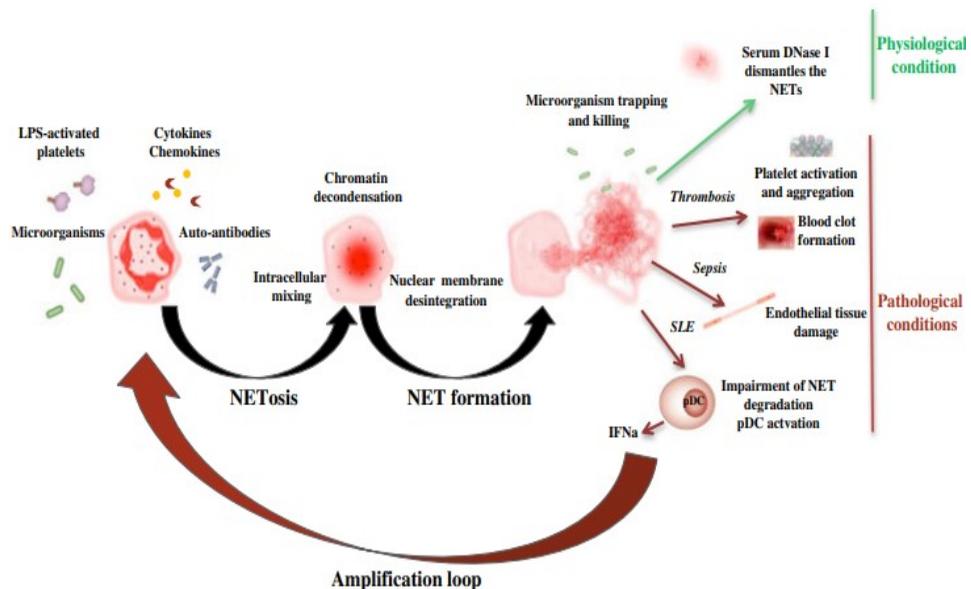


FIGURA 9. Trappole extracellulari dei neutrofili in condizioni fisiologiche e patologiche [15].

Oltre all'eterogeneità del profilo di espressione genica i neutrofili sono stati classificati in base alla loro sedimentazione. Perciò distinguiamo, neutrofili a bassa densità (LDN), neutrofili a densità normale (NDN) e neutrofili ad alta densità

(HDN). LDN, comprendenti sia neutrofili immaturi che maturi, sono stati riconosciuti per accumularsi nel tumore. Vengono descritti come dotati di proprietà immunosoppressive, ed è per questo che non si trovano nel sangue di soggetti sani, ma il loro numero è in discreto aumento in circostanze infiammatorie e patologiche. Tuttavia, sono stati osservati neutrofili immunosoppressivi anche nella frazione HDN [12]. Un ruolo cruciale nel reclutamento dei neutrofili nel microambiente tumorale è svolto dalla chemochina IL-8 che agisce tramite CXCR1 e CXCR2 per chemioattrarre neutrofili e altri leucociti mieloidi. Una caratteristica particolare di IL-8 o CXCL8 è che può attivare sia CXCR1 che CXCR2, a differenza della maggior parte delle altre chemochine ELR+ che coinvolgono principalmente solo CXCR2. Molte chemochine della famiglia CXC ELR+ sono sovraespresse nel cancro, tra cui CXCL1, 2, 5, 6 e 8. IL-8 è una chemochina frequentemente up-regolata nei tessuti maligni umani e una frazione di pazienti mostra un aumento dei livelli circolanti di IL-8 negli stadi avanzati del tumore. Promuove inoltre la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) delle cellule tumorali. Un altro ruolo importante di IL-8 nella progressione del cancro è l'effetto pro-angiogenico diretto, riportato in numerosi studi, che potrebbe svolgere un ruolo chiave come meccanismo di fuga compensativo in presenza di VEGF [19].

1.5 IL DUPLICE RUOLO SVOLTO DAI TAN

Una differenza significativa riscontrata tra i TAN con fenotipo 1 e 2 è il novero di citochine e chemochine da essi possedute, a sostegno dell'idea che i neutrofili tumorali abbiano un ruolo importante nell'equilibrio, tra stati di attivazione e soppressione, del sistema immunitario implicato nella cancerogenesi (Figura 10). N1 esprimono livelli più elevati delle citochine pro-infiammatorie, GM-CSF, IL-12 e TNF- α , insieme a varie chemochine che attraggono linfociti T e macrofagi (CXCL10, CCL7, CCL2 e CCL3). Tuttavia, con la progressione del tumore, queste funzioni diminuiscono e risulta predominante il fenotipo N2; con la secrezione attiva di CCL17, seguita dal reclutamento di cellule T regolatorie (Treg) nel microambiente tumorale e l'espressione di TGF- β 1, la cui inibizione induce il

fenotipo N1, citotossico per le cellule tumorali. Ciò comporta l'uccisione diretta delle cellule tumorali mediante ROS e l'elevata espressione di ICAM-1 [20].

Una delle caratteristiche principali dei neutrofili N2 è l'elevata espressione di gelatinasi B/MMP9, VEGF e CXCR4. Alti livelli di arginasi nei TAN di tipo 2 sono correlati alla soppressione dell'immunità delle cellule T. Invece, i neutrofili N1 sono caratterizzati dall'espressione di chemochine immunoattivanti e bassi livelli di arginasi [21].

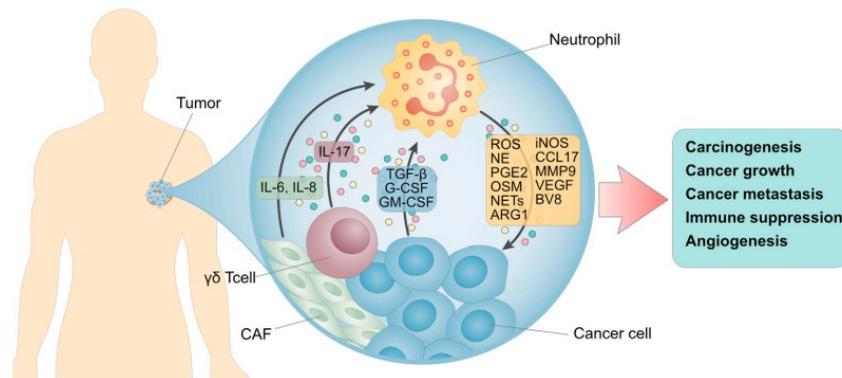


FIGURA 10. Il coinvolgimento dei neutrofili e dei loro effettori nello sviluppo e nella progressione del cancro [21].

Nel dettaglio, per quanto riguarda il ruolo dei neutrofili antitumorali N1, l'esempio più chiaro di citotossicità nei confronti delle cellule maligne è la produzione di ROS, quali il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'acido ipocloroso (HOCl). Un altro meccanismo messo in atto dai neutrofili è la citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC), attraverso l'espressione dei recettori Fc (FcR) che la regolano in differenti tipi di cancro, tra cui il linfoma non Hodgkin e il carcinoma mammario. I neutrofili esprimono diversi sottotipi di FcR in grado di indurre ADCC, tra cui $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RIIa$ (CD32) e $Fc\gamma RIIIb$ (CD16b), la cui presenza superficiale aumenta in seguito a stimolazione del G-CSF [22]. Per merito della loro capacità di presentare gli antigeni, i neutrofili, possono attivare in modo diretto una risposta da parte delle cellule T antitumorali $CD8^+$ ed inoltre sono anche in grado di attivare le cellule dendritiche e le cellule T attraverso il rilascio di NET. Per quanto concerne invece i neutrofili polarizzati N2, essi sono abili nel promuovere la crescita e la progressione del tumore per mezzo di molteplici meccanismi che comprendono

l'angiogenesi, il potenziamento della proliferazione, la metastatizzazione e la repressione della risposta immunitaria. Parecchie evidenze scientifiche supportano l'esistenza di un ruolo pro-metastatico dei neutrofili. Ad esempio, in un modello murino di carcinoma mammario, è stato dimostrato che alcuni elementi provenienti dai neutrofili mediano la metastatizzazione [23]. I neutrofili interagendo con le cellule tumorali attraverso l'integrina $\beta 2$, ne stimolano la migrazione [24]. Inoltre, l'immunosoppressione promossa dai neutrofili è stata anche correlata ad un alterato metabolismo della L-arginina e ad un coinvolgimento di ROS. Nello specifico, H_2O_2 sopprime l'attivazione e la proliferazione delle cellule T, tramite apoptosi o inibendo l'attivazione delle cellule bloccando NF- κ B. La funzione delle cellule T potrebbe essere inoltre minata anche dai neutrofili soppressivi con l'interazione tra PD-1, espresso dai linfociti T, e PD-L1 espresso dai neutrofili; a causa dell'induzione da parte di IFN- γ e GM-CSF o da condizioni di ipossia. Affinché i neutrofili possano sopprimere le risposte delle cellule T, è necessario che si generi uno stretto contatto cellula-cellula attraverso l'espressione dell'integrina Mac-1 sulla loro superficie [25]. Infine, anche l'incremento delle Treg, reclutate dai neutrofili tramite la secrezione di CCL17, è considerato di grande contributo al microambiente immunosoppressivo tumorale [26].

1.6 NEUTROFILI E METASTASI

Quando si parla di metastasi si fa riferimento al fenomeno di migrazione delle cellule neoplastiche, che dal sito d'origine del tumore primario si spostano in altri tessuti dell'organismo (Figura 11). Il ruolo dei neutrofili nelle metastasi dei tumori solidi rimane ampiamente controverso, in quanto in modelli preclinici sono stati riportati effetti sia pro-metastatici che anti-metastatici. Utilizzando modelli murini di carcinoma mammario, è stato dimostrato che gli effetti metastatizzanti dei neutrofili sono dettati dallo stato delle cellule NK dell'ospite. Nei topi con deficit di cellule NK, i neutrofili espansi dal fattore di stimolazione delle colonie di granulociti mostrano un effetto inibitorio sulla colonizzazione metastatica delle cellule del tumore al seno nel polmone. Al contrario, nei topi competenti per le cellule NK, i neutrofili facilitano la colonizzazione metastatica negli stessi modelli tumorali. In un sistema di co-cultura ex vivo neutrofili-cellule NK-cellule tumorali,

i neutrofili hanno dimostrato di essere potenzialmente in grado di sopprimere l'attività tumorale delle cellule NK, mentre loro stessi sono risultati tumoricidi. È interessante sottolineare come questi due effetti modulatori dei neutrofili siano entrambi mediati da ROS [27]. I meccanismi di base attraverso i quali i neutrofili possono agire per promuovere lo sviluppo di metastasi sono diversi, tra cui i NET, in grado di intrappolare le cellule tumorali circolanti (circulating tumor cells, CTC) promuovendo così l'adesione precoce delle cellule neoplastiche a siti di organi distanti e facilitando la progressione della malattia metastatica [28]. Inoltre, vari esperimenti hanno dimostrato che l'esposizione dei neutrofili al GM-CSF incrementa la produzione di oncostatina M, una citochina contribuente allo sviluppo di metastasi [29]. Infine, anche l'interazione dei neutrofili con le cellule endoteliali facilita lo stravasamento di cellule tumorali nella circolazione. È chiaro che una deplezione di neutrofili tumorali diminuirebbe l'incidenza di metastasi, proprio perchè i neutrofili giocano un ruolo chiave nella stadiazione e diffusione del tumore.

In un modello murino di carcinoma polmonare metastatico, si è dimostrato che la chemochina CCL2 promuove l'attivazione dei neutrofili verso un fenotipo anti-metastatico. In questi neutrofili prevaleva un'attività citotossica tumorale mediata dalla produzione di H₂O₂ e ROS. Un altro studio riporta come il proto-oncogene MET sia stato correlato all'inibizione della crescita del tumore primario e della formazione di metastasi, sempre in dipendenza dai neutrofili. Infatti, la delezione di MET ha portato ad una ridotta infiltrazione di neutrofili ed una riduzione delle metastasi [30].

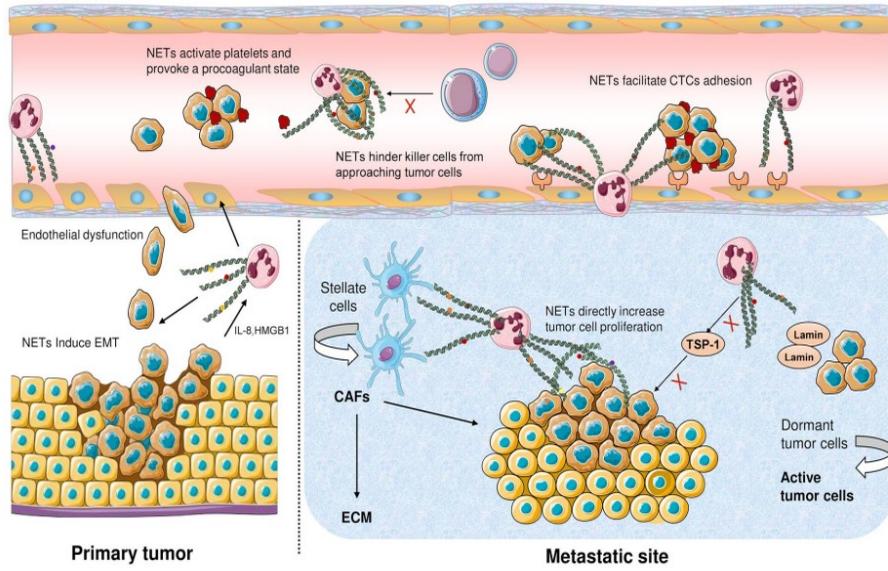


FIGURA 11. I NET promuovono la crescita del tumore e le metastasi. Nel tumore primario, il rilascio di IL-8 e HMGB1 predispongono la formazione di NET, che induce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e promuove la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali in altri tessuti o organi [31].

2. SCOPO DEL LAVORO

Le colture cellulari bidimensionali rispecchiano solo parzialmente le peculiarità, il pattern morfo-molecolare delle cellule tumorali e soprattutto la complessità del microambiente *in vivo*. I modelli cellulari in 3D, invece, possono riprodurre il comportamento invasivo delle cellule tumorali umane, mimare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare e ricreare il microambiente ideale per i meccanismi che intercorrono tra tumore e componente immunitaria. Nello specifico, è importante sottolineare come il reclutamento dei leucociti, in particolare dei granulociti neutrofili nel microambiente tumorale, sia regolato da molteplici mediatori; tra cui citochine, lipidi e fattori di crescita secreti dalle stesse cellule tumorali. In passato si pensava che i neutrofili fossero una popolazione semplice ed omogenea; invece, studi più recenti hanno dimostrato una plasticità dipendente dall'ambiente in cui si trovano. In conformità con questi studi, è emerso che i neutrofili interagiscono dinamicamente con il microambiente tumorale e sono in grado di assumere un ruolo cruciale nella progressione della malattia.

Il presente elaborato di tesi si propone di considerare tre linee cellulari umane di tumore, A-375, MDA-MB-231 e U-87, rispettivamente di melanoma cutaneo, carcinoma mammario e glioblastoma. A partire da queste linee, sono state sviluppate co-colture sferoidali, quindi 3D, con neutrofili isolati per mimare il microambiente tumorale. Adottando diverse condizioni, è stato studiato come il microambiente tumorale o i mediatori rilasciati dal tumore vadano ad influenzare la differenziazione fenotipica e funzionale dei neutrofili. E una volta osservata la differenziazione funzionale dei neutrofili in questi modelli, verso il fenotipo pro-tumorale (N2), il focus di questo lavoro inoltre è stato quello di andare a valutare i livelli di espressione ed il rilascio di alcuni marcatori specifici, da parte dei neutrofili stessi, coinvolti nel promuovere la neoangiogenesi e le metastasi tumorale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ISOLAMENTO DEI NEUTROFILI

I neutrofili sono stati isolati da campioni di sangue periferico prelevati da volontari sani, previo consenso informato. La totalità dei passaggi dell'isolamento è stata svolta in condizioni sterili, sotto una cappa a flusso laminare verticale. Una quantità di sangue è stata versata in una falcon e miscelata con una quantità uguale di tampone fosfato salino (PBS), in rapporto 1:1. Dopodiché, a 20 ml della miscela sangue-PBS sono stati aggiunti 10 ml di soluzione salina 0,9% con destrano 500 al 3%, in rapporto 1:2. Si lascia riposare la miscela per circa 30 minuti, sotto cappa a luce spenta, per consentire la sedimentazione eritrocitaria. Il surnatante ricco di leucociti è stato poi recuperato e centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti a 25°. In seguito, il pellet è stato in risospeso in PBS, stratificato accuratamente su Ficoll-Paque Plus in rapporto 1:2, e centrifugato a 1800 rpm per 15 minuti senza freno, per consentire una stratificazione omogenea (Figura 12).

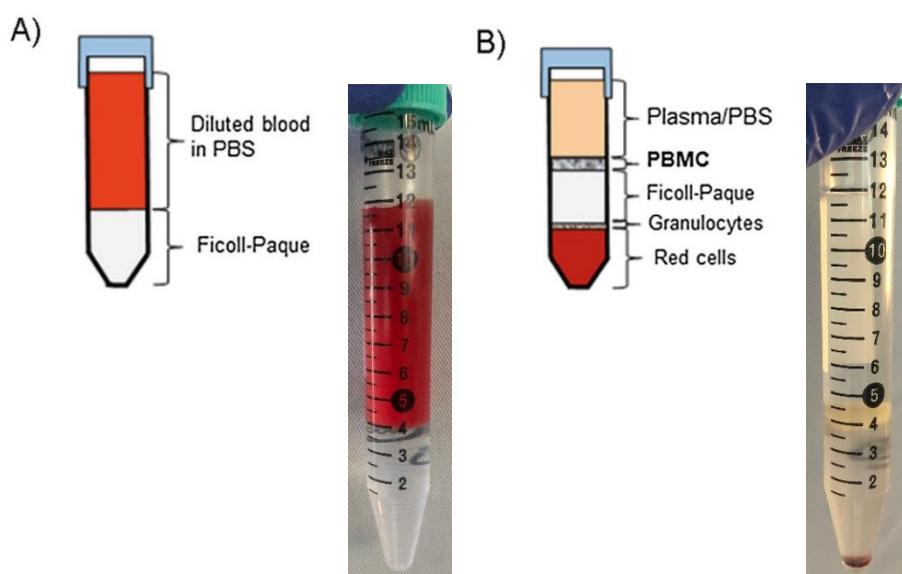


FIGURA 12. A) Campione di sangue stratificato su Ficoll-Paque PLUS prima della centrifugazione. B) Campione di sangue dopo la centrifugazione.

Dopo centrifugazione, il surnatante contenente lo strato cellulare mononucleare è stato scartato. Per lisare i globuli rossi, il pellet rimanente è stato risospeso con cloruro di sodio 0,2%, che in seguito è stato miscelato con un volume uguale di cloruro di sodio 1,6% ed infine centrifugato a 900 rpm per 5 minuti [32]. Al termine

dell'isolamento, i granulociti neutrofili sono stati coltivati in terreno RPMI arricchito con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% soluzione antibiotica di kanamicina, 1% di L-glutammina, 1% di aminoacidi non essenziali e 1% di piruvato di sodio.

3.2 ANALISI MORFOLOGICA DEI NEUTROFILI

Per avere la certezza che l'isolamento sia avvenuto correttamente, nonché per l'identificazione ed il conteggio dei neutrofili, il metodo adottato è stato quello di andare ad eseguire una colorazione con blu di metilene 1% sul campione di cellule isolate. Sono stati allestiti vetrini sui quali sono stati eseguiti strisci partendo da una goccia di campione. Circa 10 μ l sono stati mescolati con un'uguale quantità di blu di metilene, per poi effettuare lo striscio con un altro vetrino. Al termine dell'operazione, si è atteso qualche minuto prima di verificare l'avvenuta colorazione al microscopio. Il risultato ottenuto ha permesso di identificare i neutrofili attraverso una colorazione nucleare viola-blu, poichè i granuli dei neutrofili sono leggermente basici e si colorano debolmente di blu con il componente azzurrofilo. Il risultato è stato inoltre confermato dalla presenza del nucleo bilobato caratteristico di questa popolazione leucocitaria. Le analisi effettuate al termine della colorazione hanno permesso di valutare come i neutrofili isolati avessero una purezza sempre superiore al 96%.



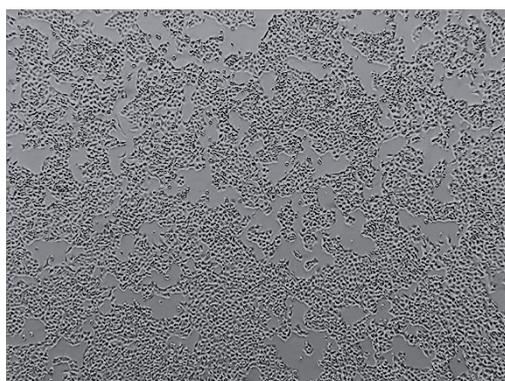
FIGURA 13. L'immagine ottenuta con microscopio ottico mostra la presenza di due neutrofili, identificabili dal loro nucleo caratteristico.

3.3 COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari utilizzate in questo lavoro di tesi sono le U-87 MG provenienti da glioblastoma umano, le A-375 da melanoma cutaneo e le MDA-MB-231 da

carcinoma mammario (Figura 13). Le cellule A375 e MDA-MB-231 sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, contenente 4500 mg/L di glucosio) integrato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum) scomplementato a 56°C per 30 minuti, 1% penicillina/streptomicina e 2 mM di L-glutammina. Le cellule U-87 MG sono state coltivate in terreno MEM (Minimal Essential Medium) arricchito con 10% di FBS, 1% di penicillina/streptomicina e 1% di L-glutammina 2 mM. Tutte le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. La morfologia delle linee cellulari è stata osservata quotidianamente al microscopio ottico. Una volta raggiunta la confluenza desiderata, le cellule sono state lavate con PBS, staccate con Tripsina 0.05%-EDTA 1mM e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm, per poi essere risospese in un terreno di coltura contenente FBS al 10%, al fine di essere utilizzate per la co-coltura o ripiastrate.

A.



B.



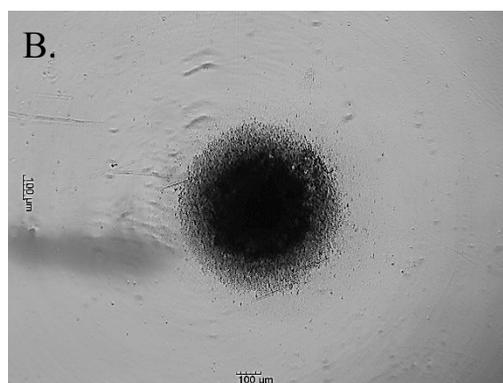
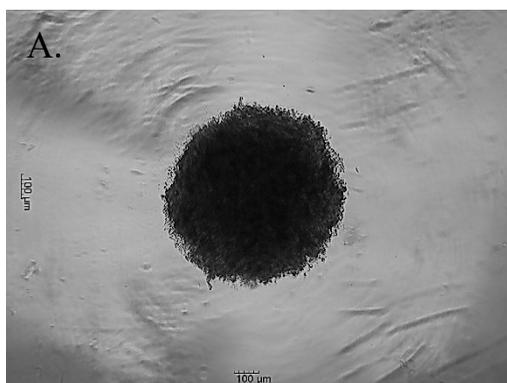
C.



FIGURA 14. A. Cellule A-375 B. Cellule U87-MG C. Cellule MDA-MB-231

3.4 SVILUPPO DI SFEROIDI MULTI CELLULARI

Per lo sviluppo di sferoidi multicellulari è stata utilizzata una soluzione di agarosio all'1% che dopo opportuno riscaldamento è stata stratificata in piastre MW 96 con fondo a U; quest'ultime successivamente esposte a raggi UV per circa 20 minuti, allo scopo di formare un sottile strato di coating sterile. In seguito, si è attesa circa un'ora per permettere al coating di asciugare, prima di procedere con la piastratura. Le cellule di ciascuna linea sono state piastrate nei vari pozzetti in un numero coerente a seconda delle dimensioni sferoidali desiderate. Per ottenere una buona resa di sferoidi, in cui è stato possibile verificare lo sviluppo del centro ipossico, abbiamo piastrato per le U87 2×10^4 cellule/pozzetto e per le altre due linee cellulari 1×10^4 cellule/pozzetto in 100 μ l di terreno. Le piastre sono state poi incubate a 37°C in atmosfera umidificata e ad una pressione di CO₂ pari al 5%, con tempistiche variabili a seconda di ogni coltura cellulare (Figura 14).



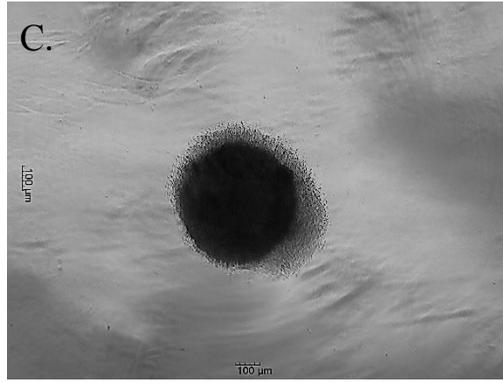


FIGURA 15. Sferoidi multicellulari delle linee A375 (A.), MDA-MB-231 (B.) e U87-MG (C.), dove è possibile identificare le cellule all'esterno ed il centro ipossico all'interno, ben visibile soprattutto nelle MDA.

3.5 CO-COLTURE: SFEROIDI E NEUTROFILI

Per valutare l'attività dei neutrofili a contatto con le cellule tumorali e dei mediatori da loro rilasciati, sono state allestite delle co-culture sferoidi/neutrofili. Essendo la maggior parte dei mediatori analizzati sostanze che vengono rilasciate all'esterno della cellula, per poter svolgere la loro attività, la loro presenza è stata valutata nelle cellule o nel surnatante. A seconda che si volessero vedere i livelli di mediatori intracellulari o rilasciati nel medium cellulare, gli sferoidi sono stati sviluppati rispettivamente in terreno contenente FBS o privo di FBS. Allo stesso modo i neutrofili sono stati preparati in terreno con o senza FBS e aggiunti agli sferoidi 4×10^4 neutrofili/sferoide. Dopo 24h di incubazione i surnatanti delle co-culture senza siero sono stati raccolti, centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti e successivamente conservati a -80°C fino al processamento. Nelle co-culture contenenti FBS sono stati raccolti i neutrofili extracellulari e gli sferoidi; entrambi sono stati pellettati e conservati anch'essi a -80°C fino al processamento.

3.6 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER WESTERN BLOT

Al fine di poter vedere i marcatori di interesse, i surnatanti raccolti sono stati concentrati mediante l'utilizzo di concentratori da centrifuga con cut-off 10KDa. I filtri posti nei concentratori sono stati preventivamente condizionati mediante il passaggio di 4 mL di terreno senza siero in centrifuga a 4°C alla velocità massima 2800 giri per 15 minuti. I surnatanti raccolti sono stati fatti scongelare in ghiaccio

e concentrati mediante centrifuga a 4°C alla velocità massima 2800 giri per 20 minuti. Al termine del processo i surnatanti erano concentrati 20 volte.

I pellet invece, sono stati scongelati in ghiaccio, risospesi in RIPA buffer completato con gli inibitori delle proteasi in rapporto 1:2. Il pellet è stato lasciato in ghiaccio per 30 minuti. Al termine dell'incubazione è stato sottoposto a 3 cicli caldo freddo costituiti da 3 minuti a -80°C seguiti da 2 minuti a 37°C. Al termine dei cicli di estrazione, le provette sono state centrifugate per 10 minuti a 13000 rpm a 4°C; i surnatanti contenenti le proteine sono stati raccolti e messi in ghiaccio, mentre i pellet caratterizzati da detriti cellulari eliminati.

La concentrazione proteica di tutti i campioni è stata determinata utilizzando il saggio di Bradford ed estrapolando i valori con la curva standard di concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA).

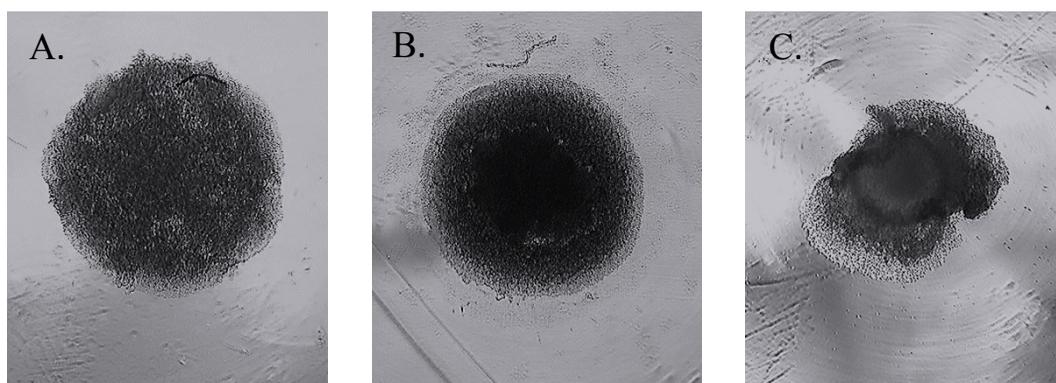


FIGURA 16. A375 (A.), MDA-MB-231 (B.) e U87-MG (C.). Migrazione dei neutrofili in co-cultura con gli sferoidi delle cellule tumorali. Si può notare la corona di neutrofili attorno agli sferoidi.

3.7 WESTERN BLOT

Il western blot è una tecnica di separazione analitica utilizzata per l'investigazione delle proteine di interesse. Le proteine si separano in base al loro peso molecolare durante la corsa su gel di poliacrilamide e vengono successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa e sottoposte a marcatura con anticorpi in grado di identificare le proteine ricercate. In particolare, i campioni preparati come descritto precedentemente sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di

poliacrilamide al 12% per i neutrofili, onde evitare di perdere proteine a più basso peso molecolare riscontrabili in questi campioni; al 10% invece per le linee tumorali. Al termine della corsa è stato eseguito il trasferimento su una membrana di nitrocellulosa e successivamente abbiamo utilizzato la colorazione di rosso Ponceau per verificare il corretto trasferimento delle proteine. La membrana è stata poi bloccata con Milk al 5% in TBS per un'ora, per poi aggiungere l'anticorpo primario nella diluizione desiderata ed incubare overnight in agitazione a 4°C. Dopo i lavaggi in TBS-T, è stato aggiunto l'anticorpo secondario e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per un'ora. L'espressione delle proteine di interesse è stata osservata tramite chemiluminescenza e rivelata al CHEMIDOC.

3.8 ANALISI STATISTICHE

Le bande dei segnali rivelate dalla lettura tramite CHEMIDOC sono state analizzate mediante un programma dedicato, Image-Lab software Bio-Rad per Windows. I risultati espressi fanno riferimento ad una media di tre esperimenti per mediatore espresso. La significatività statistica è stata determinata attraverso il programma Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 LO STUDIO DEI TAN

Negli ultimi anni, l'interesse per il ruolo dei neutrofili nella sfera dei tumori è aumentato significativamente perché i dati accumulati evidenziano ruoli importanti e differenti nella biologia del tumore. Diversi studi hanno fatto emergere prove convincenti riguardo le funzioni dei neutrofili pro-tumorali (N2), in grado di promuovere l'angiogenesi, la diffusione delle cellule maligne e la metastatizzazione; sia come neutrofili immaturi (G-MDSC) che come cellule mature, per esempio attirando le cellule T-reg nel microambiente tumorale. Al contrario, altri studi hanno dimostrato che i neutrofili possiedono anche caratteristiche antitumorali, fenotipo N1, in quanto hanno la capacità di uccidere le cellule tumorali direttamente, attraverso la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente o infine stimolando la risposta T citotossica e limitare così la crescita della massa tumorale e la formazione di metastasi [33]. Ad oggi, il meccanismo che sta alla base di questa polarizzazione non è stato ancora completamente definito, ad esempio non è ancora del tutto chiaro se la stessa polarizzazione possa essere mediata da molecole solubili rilasciate dal tumore nel flusso sanguigno o da un contatto cellulare diretto tra neutrofili e cellule tumorali. I neutrofili vengono reclutati nel sito del tumore tramite segnali prodotti dalle cellule neoplastiche, quali chemochine, perossido di idrogeno e citochine [34]. Questi segnali inducono i TAN a rilasciare fattori che agiscono sul rimodellamento dell'ECM nel microambiente tumorale o direttamente sulle cellule tumorali incentivando la proliferazione e diffusione metastatica. Sulla base dei dati in letteratura e per provare a spiegare i punti ancora critici abbiamo studiato il destino dei neutrofili in co-cultura con le cellule tumorali e cercato di comprendere come i neutrofili vengono reclutati, se la differenziazione pro-tumorale origina neutrofili con uno stesso fenotipo e funzione e quali sono le complesse vie che permettono loro di interagire con le cellule tumorali nel microambiente.

I primi risultati ottenuti indicano che le linee cellulari utilizzate richiamano i neutrofili in modo differente e che la migrazione negli sferoidi è proporzionale al livello di IL-8 rilasciata, fattore chemiotattico dei neutrofili di primaria importanza. Con le linee di melanoma cutaneo A375 e di cancro alla mammella MDA-MB-231 che producono il maggior quantitativo di IL-8 e reclutano più neutrofili, seguite

dalla linea di glioblastoma U87-MG che secerne meno IL-8 e al contempo richiama meno neutrofili. Quest'ultimi, in contatto con il solo medium delle colture tumorali, iniziano a modificare il loro fenotipo, raggiungendo la differenziazione più marcata per i neutrofili entrati a contatto con le cellule tumorali. Alcuni marcatori modificano la loro espressione in presenza di ogni linea come, ad esempio, la up-regolazione di CD44 e CD16; mentre altri in modo linea-specifico come PD-L1 solo per i neutrofili in contatto con le U87-MG. Questo suggerisce che per definire il loro ruolo pro- o anti-tumorale sia necessario andare a studiarne la funzionalità. Gli esperimenti coinvolti in questo senso hanno evidenziato come i neutrofili in contatto solo con il surnatante e quelli a contatto con le cellule avessero la capacità di inibire la risposta immunitaria di PBMC stimolati con PHA. L'intensità dell'immunosoppressione risultava diversa a seconda della linea tumorale con cui erano entrati in contatto.

I dati ottenuti suggeriscono che i neutrofili, nonostante assumano lo stesso ruolo pro-tumorale, differiscano in termini di fenotipo e funzione a seconda del tumore con cui entrano in contatto, supportando la recente definizione dei neutrofili come cellule plastiche. Suggestendo quindi che possono differenziare, assumendo funzioni diverse a seconda della tipologia e dello stadio del tumore, ma anche in base al ruolo in cui sono implicati nel favorirne la progressione.

Per poter iniziare ad avere un'indicazione sulla diversificazione funzionale a seconda del tumore, siamo andati a valutare l'espressione ed il rilascio dei principali mediatori coinvolti nelle funzioni pro-tumorali riconosciute ai neutrofili.

4.2 L'ESPRESSIONE DI MARCATORI TIPICI UP-REGOLATI IN CONTESTO TUMORALE

I neutrofili associati al tumore sono in grado di rilasciare diverse molecole che possono condizionare il TME, agendo sia su cellule mutate sia su cellule dello stroma. Numerose prove suggeriscono come le proteine granulari, quali gelatinasi B (MMP-9), elastasi neutrofila (NE) ed arginasi-1 (ARG-1) rilasciate dai neutrofili attivati, possano risultare over-esprese in contesto tumorale e considerate come significativi marcatori dei neutrofili pro-tumorali. Abbiamo inoltre preso in

considerazione anche markers tumorali, quali la nicotinammide fosforibosiltransferasi (eNAMPT), enzima importante per la sintesi del NAD (nicotinammide adenina dinucleotide) secreta da alcune cellule tumorali e la MMP-9.

4.2.1 MMP-9

Le metalloproteinasi della matrice (MMP) sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti di cui il primo membro, MMP-1, è stato scoperto 60 anni fa. Le MMP furono introdotte per la prima volta come proteasi secrete, in grado di scindere le proteine della matrice extracellulare in diverse condizioni fisiologiche e patologiche. Il loro ruolo è apparso rilevante in diversi processi, come la differenziazione cellulare, la proliferazione, la guarigione delle ferite, l'apoptosi e l'angiogenesi. L' MMP-9 si presenta con tre domini comuni a tutte: il pro-peptide, il dominio catalitico, e il dominio C-terminale di tipo emopexina. Le MMP sono inizialmente espresse in uno stato enzimaticamente inattivo, dovuto all'interazione di un residuo di cisteina del dominio pro-peptidico con lo zinco del sito catalitico. Solo dopo l'arresto di questa interazione mediante un meccanismo chiamato *cysteine switch*, solitamente mediato dalla rimozione proteolitica del pro-dominio, l'enzima diventa proteoliticamente attivo. La funzione delle MMP può essere influenzata anche dallo stress ossidativo, poiché la risposta infiammatoria nel sito del tumore crea ingenti quantità di ROS che vengono prodotti dai neutrofili. Questi ossidanti attivano inizialmente le MMP attraverso l'ossidazione della cisteina del dominio pro-peptidico [35].

Il coinvolgimento delle MMP nell'angiogenesi tumorale è rilevante, infatti la MMP-9, immagazzinata nei granuli terziari dei neutrofili, quando viene rilasciata esternamente è in grado di potenziare l'angiogenesi attraverso la degradazione della membrana basale vascolare, il rimodellamento dell'ECM e la stimolazione della successiva migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali. Per valutare l'espressione ed il rilascio di MMP-9, da parte dei neutrofili, abbiamo raccolto rispettivamente il loro surnatante ed il pellet dopo 24 ore di co-coltura con gli sferoidi di tutte le linee in esame. Dato che durante la trasformazione neoplastica

alcune cellule acquisiscono la capacità di produrre e rilasciare MMP-9 per promuovere la loro crescita, metastatizzazione e vascolarizzazione, abbiamo valutato lo stesso marcatore nei surnatanti, per tenere in considerazione la possibile influenza del centro ipossico è stata valutata sia nei pellet delle cellule tumorali 2D che sferoidali.

L'analisi delle misurazioni densitometriche delle bande delle membrane del western blot ha permesso di osservare come i neutrofilo producano in modo costitutivo la MMP-9 e, nelle condizioni sperimentali utilizzate, una parte viene anche rilasciata nell'ambiente extracellulare. Andando a vedere la linea di melanoma A375 possiamo osservare come nella coltura 2D la produzione di MMP-9 è decisamente ridotta ma aumenta leggermente quando le cellule vengono coltivate come sferoide. In letteratura è riportato che le cellule A375 basalmente non esprimono MMP-9, ma questa può essere indotta da stimoli come la fibronectina attraverso la stimolazione della via FAK/ERK [36]. Altri studi suggeriscono come la stimolazione con TNF possa indurre la produzione di MMP-9 in queste cellule ipotizzando come l'espressione di MMP-9 nella linea A375 possa essere modulata. Un fattore che potrebbe aver portato a questo risultato è il centro ipossico; infatti, in diversi studi si osserva come con la formazione del centro ipossico si verifichi anche la produzione di MMP-9 in diverse linee tumorali con lo scopo di promuovere l'angiogenesi [37]. Sorprendentemente si osserva la riduzione dei livelli di espressione di MMP-9 nei neutrofilo coltivati in presenza degli sferoidi, l'assenza del segnale nel surnatante delle co-culture sta ad indicare che la riduzione non è legata al release extracellulare (Figura 17).

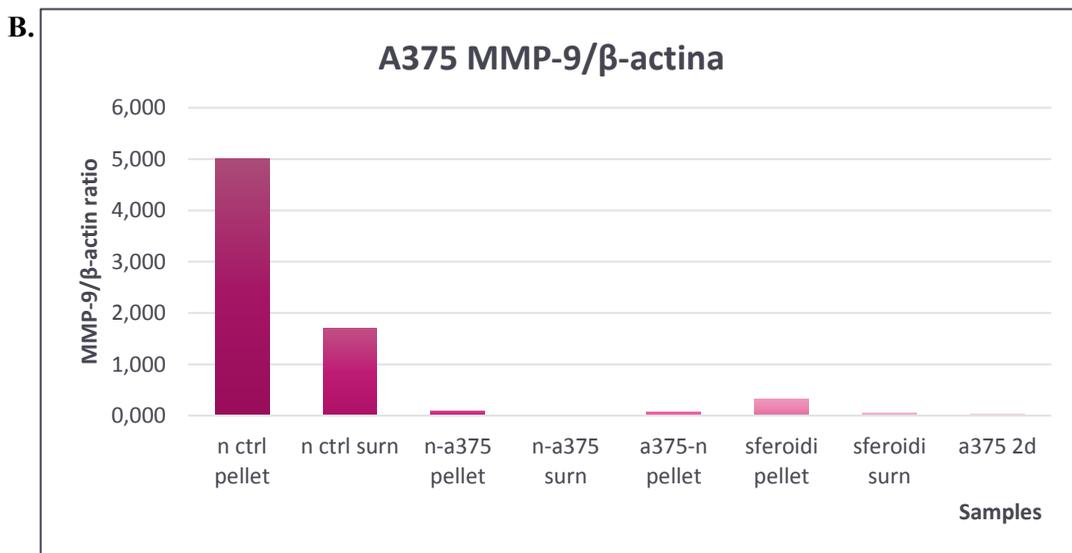
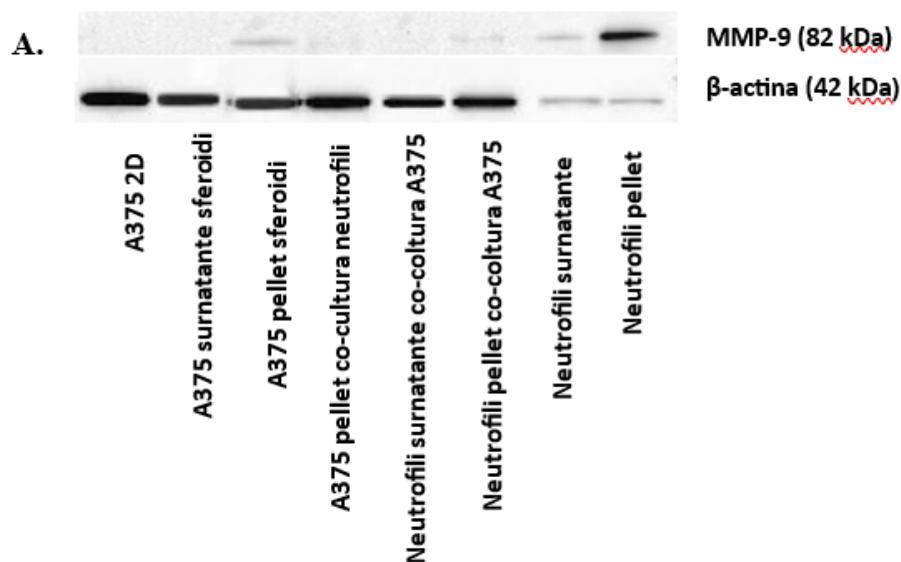
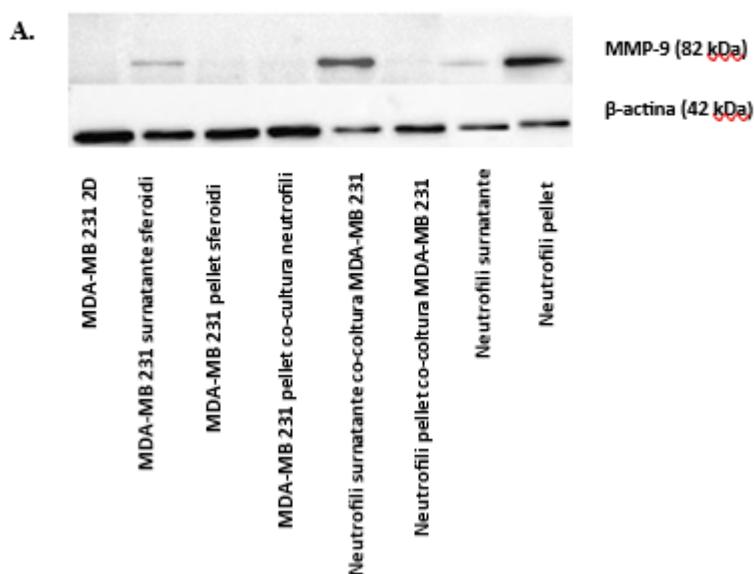


FIGURA 17. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'MMP-9 in rapporto con la β-actina delle A375 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di MMP-9 nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato. (B).

Differentemente se consideriamo la linea di carcinoma alla mammella triplo negativo MDA-MB 231 si può vedere come le stesse cellule tumorali producano MMP-9 che viene prevalentemente rilasciato nel medium cellulare. Dati di letteratura indicano che il carcinoma mammario è spesso associato all'espressione di MMP-9 e che i livelli correlano con una prognosi infausta [38]. Tra le linee cellulari maggiormente utilizzate negli studi in vitro, le MDA-MB 231 derivanti da carcinoma triplo negativo, la forma più aggressiva di carcinoma mammario, sono

quelle in cui si riscontra il maggior livello di MMP-9. Il valore di MMP-9 presente nel surnatante della co-cultura neutrofili/MDA-MB 231 sembra essere più alto di quello rilasciato dalle sole cellule tumorali e dai soli neutrofili. Questo potrebbe essere il risultato di un aumento del rilascio da parte dei neutrofili stimolati dalle cellule tumorali o di un aumento della produzione e rilascio da parte delle cellule tumorali in risposta alla presenza dei neutrofili (Figura 18). In diversi modelli tumorali è stato osservato un aumento dei livelli di espressione di MMP-9 da parte dei neutrofili infiltranti il tumore e anche un aumento del suo rilascio. Tale rilascio che viene regolato da numerosi fattori, tra cui citochine e chemochine come IL-8 e TGF- β [39], sembra andare a favorire il processo angiogenico [40], la progressione tumorale e anche la metastatizzazione. Alcuni studi suggeriscono come i valori di MMP-9 plasmatica rilasciata dai neutrofili infiltranti il tumore possa rappresentare un fattore prognostico per il successo terapeutico.



B.

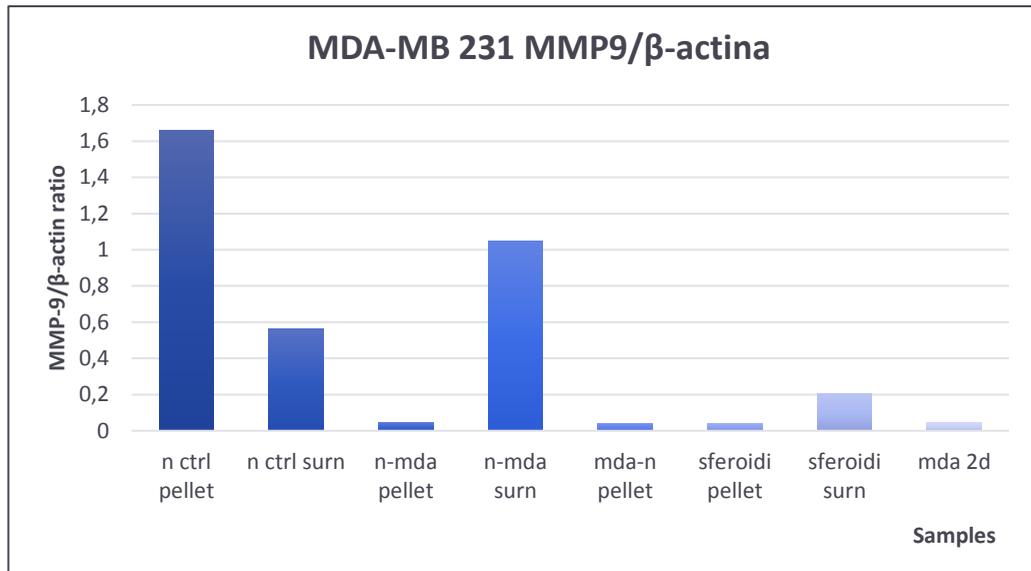
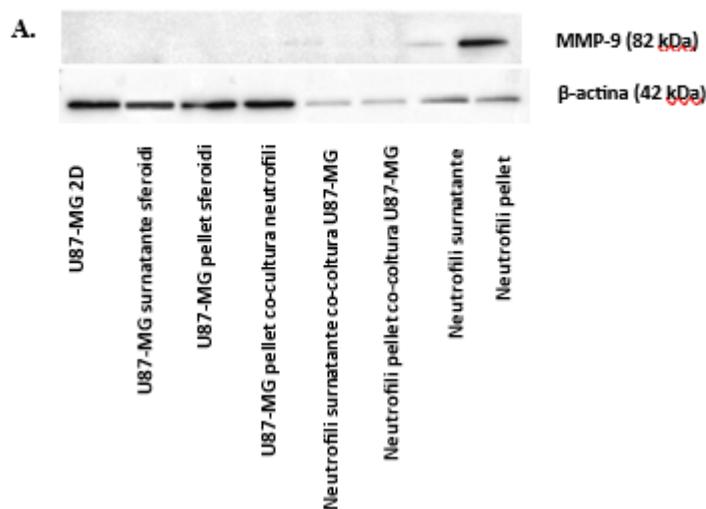


FIGURA 18. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'MMP-9 in rapporto con la β -actina delle MDA-MB-231 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di MMP-9 nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato. (B).

Nel momento in cui si vanno ad analizzare i dati relativi alla linea di glioblastoma U87 MG, il quadro risulta essere ancora diverso. Infatti, nel nostro modello non si osserva produzione o rilascio di MMP-9, né dalle cellule cresciute in 2D né in quelle coltivate in 3D. La frequenza produzione e il rilascio di MMP-9 nei gliomi non è stata totalmente verificata, sebbene alcuni studi sembrano suggerire come la progressione del glioma sia associata ad un aumento dei livelli di MMP-9, ma tale dato è ancora da verificare. Si ritrovano dati contrastanti sull'espressione di MMP-9 da parte delle cellule U87 che risulta essere molto bassa o assente. Gli studi condotti però indicano che la MMP-9 determina un aumento della crescita cellulare delle U87 e del loro potenziale clonogenico favorendo la progressione verso un fenotipo più aggressivo [41]. Quando i neutrofili vengono co-coltivati con le cellule U87 si osserva una riduzione dei livelli di MMP-9 intracellulari anche se si osserva ancora MMP-9 nel surnatante (Figura 19).



B.

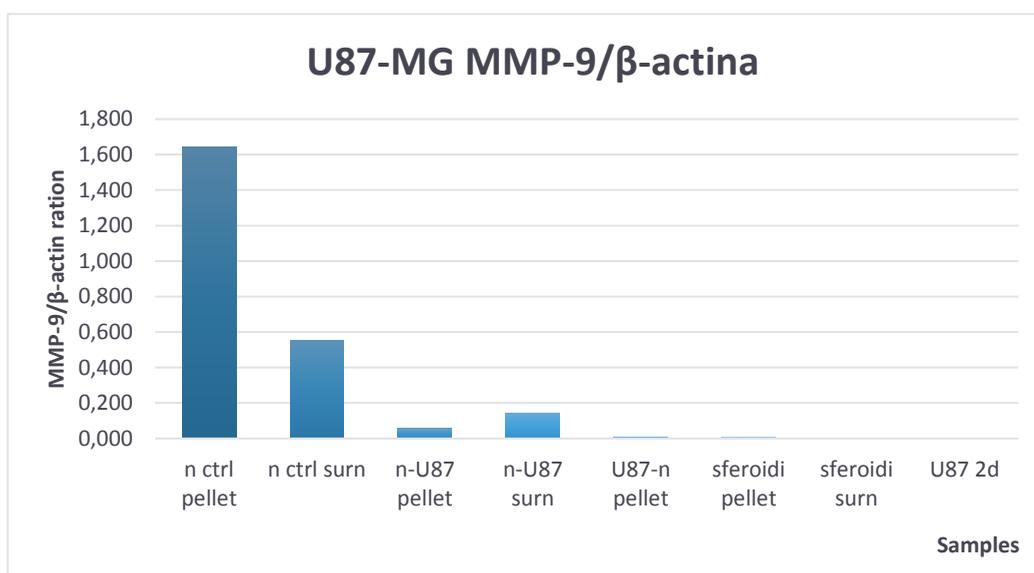


FIGURA 19. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'MMP-9 in rapporto con la β-actina delle U87-MG (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di MMP-9 nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato. (B).

Visto il potenziale della MMP-9 non solo di favorire il rimodellamento cellulare ma anche la progressione verso un fenotipo più aggressivo è nostra intenzione andare a valutare l'effetto sulle cellule oggetto di studio.

Diversi studi hanno evidenziato un aumento dei livelli di MMP-9 e del suo rilascio nei neutrofili associati a diversi tumori, i neutrofili di cui noi abbiamo raccolto il pellet sono quelli che sono entrati in contatto solo esternamente con il tumore. Sarebbe interessante isolare i neutrofili entrati nello sferoide per vedere se in questi

vi sia l'up regolazione della MMP-9. Dai dati ottenuti precedentemente sul fenotipo appare evidente che le cellule che penetrano lo sferoide hanno un fenotipo più pronunciato o addirittura diverso rispetto a quelli che rimangono esternamente suggerendo come il microambiente dello sferoide fornisca stimoli/segnali diversi che possano influenzare la differenziazione dei neutrofili e probabilmente anche la funzione.

4.2.2 NE

Un altro marker specifico dei neutrofili che abbiamo preso in considerazione è l'elastasi neutrofila. Questo enzima viene rilasciato nello spazio extracellulare attraverso la degranolazione o durante la NETosi. Questa proteina media importanti vie coinvolte nella crescita del tumore primario, come l'induzione diretta della proliferazione e la stimolazione dell'angiogenesi. Una spiegazione di come l'elastasi dei neutrofili e i NET facilitino la diffusione metastatica è l'induzione della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), per cui le cellule tumorali diventano più migratorie e invasive, come nel caso del carcinoma mammario [42].

A livello basale i neutrofili esprimono alti livelli di NE senza rilasciarla nel medium cellulare; infatti, il rilascio è secondario alla loro attivazione. Come si può osservare dall'analisi dei risultati ottenuti (Figura 20) quando i neutrofili vengono co-coltivati con la linea cellulare A375 si ha una riduzione del quantitativo di elastasi intracellulare associato ad un aumento dei livelli di NE extracellulare. Da letteratura si evidenzia come l'espressione e l'attività dell'elastasi dei neutrofili sono aumentate nella carcinogenesi associata alla colite cronica [43]. Inoltre, in un modello, *in vitro*, in cui i neutrofili sono stati co-coltivati con cellule di cancro del polmone si rivela che sono necessarie interazioni dirette cellula-cellula per stimolare il rilascio mediato dall'elastasi dei neutrofili e l'induzione della proliferazione attraverso una via dipendente dalla COX-2. [44]

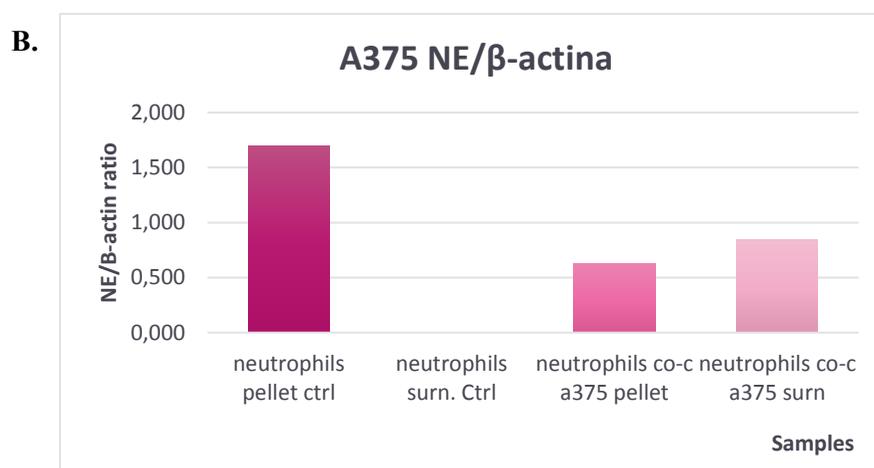
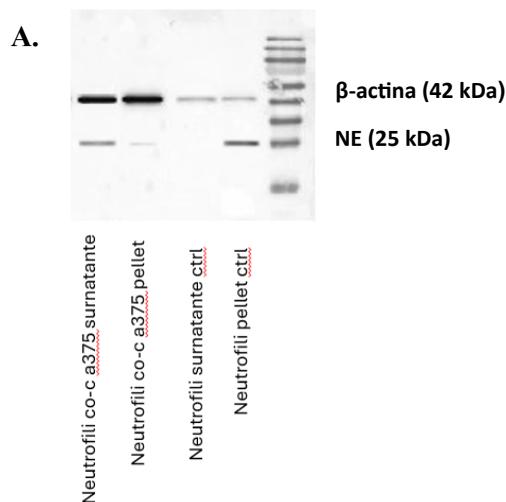


FIGURA 20. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'elastasi neutrofila (NE), in rapporto con la β -actina delle A375 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di NE nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Osservando i risultati ottenuti riportati dal grafico delle MDA-MB 231, è possibile notare una tendenza invertita, in confronto alle A375, nei neutrofili co-coltivati con le tumorali (Figura 21). Poiché si ha un release minore nel medium cellulare rispetto a quanto ne producono. In uno studio effettuato su biopsie di tumore mammario è stata osservata la presenza di NE espressa e rilasciata dai TAN infiltranti. Studi condotti su diverse linee di carcinoma mammario, tra cui la linea MDA-MB 231, hanno evidenziato come le cellule tumorali non siano in grado di produrre NE ma possono assorbire in modo antigene-dipendente quella prodotta dai TAN [45]. Questo meccanismo potrebbe spiegare la riduzione dei livelli di NE nel surnatante

rispetto al modello precedente. Un altro fattore che potrebbe giustificare la differenza osservata è una diversa capacità delle cellule tumorali di stimolare il rilascio di granuli, quindi NE da parte dei TAN.

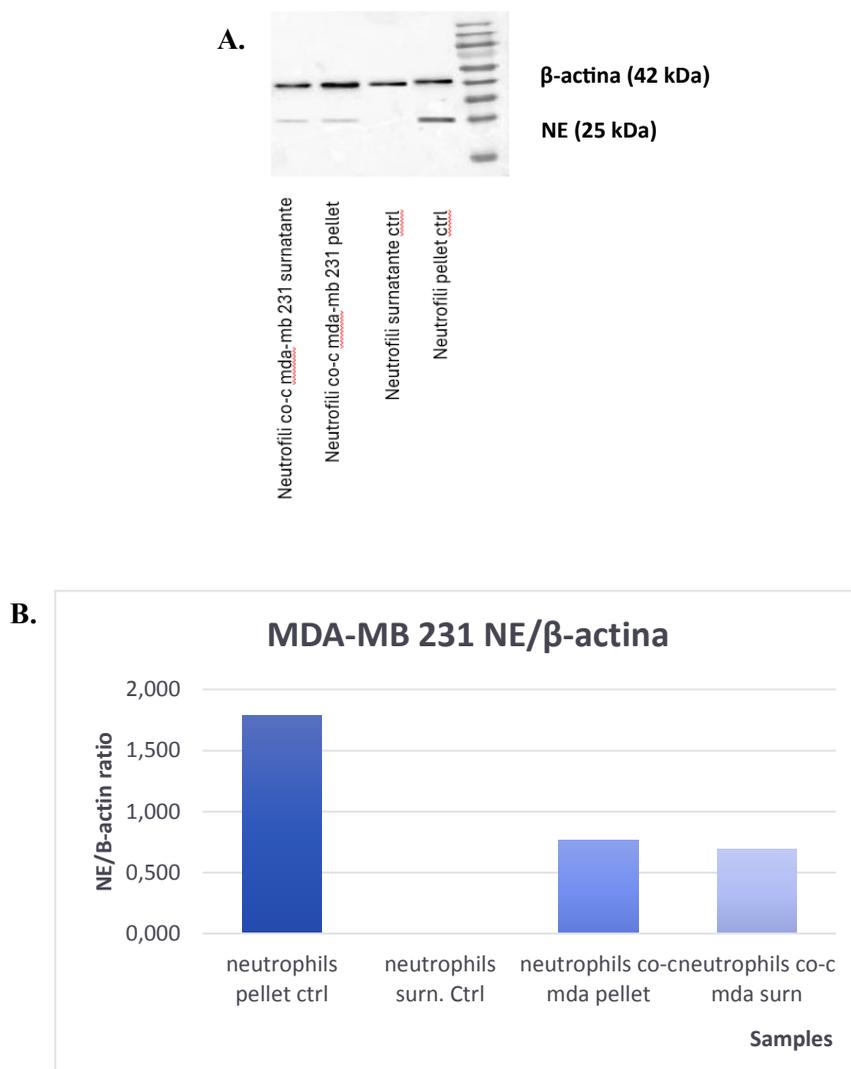


FIGURA 21. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di NE, in rapporto con la β-actina delle MDA-MB 231 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di NE nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Anche per le U87 (Figura 22), come nel caso delle A375, quando i neutrofili vengono co-coltivati con le tumorali si osserva una riduzione del quantitativo di elastasi intracellulare associato ad un aumento significativo dei livelli di NE extracellulare. Questo dato suggerisce che tutte le linee cellulari siano in grado di stimolare i neutrofili verso il rilascio della NE. L'incremento maggiore di NE rilasciata si osserva con la linea di glioblastoma U87. Uno studio condotto per

verificare il ruolo dei neutrofili nella progressione del glioblastoma ha evidenziato come il medium condizionato delle cellule U87 MG sia in grado di indurre NETosi nei neutrofili, dato che NE è uno degli enzimi rilasciati con la NETosi questo processo potrebbe essere responsabile dell'aumento che osserviamo in questo modello (Front immunol 2023 Rubenich). Oltre che nella cancerogenesi, l'elastasi neutrofila è implicata nel rimodellamento della matrice in una varietà di processi patologici, quali enfisema, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e aterosclerosi [46].

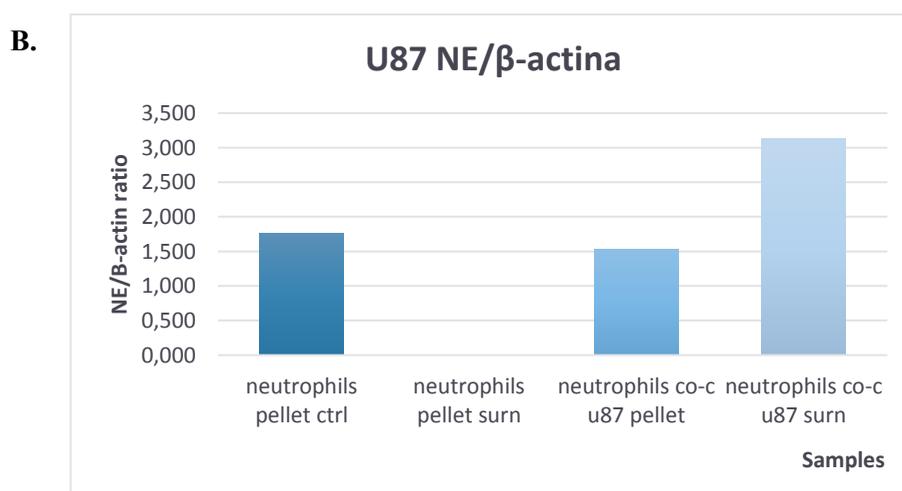
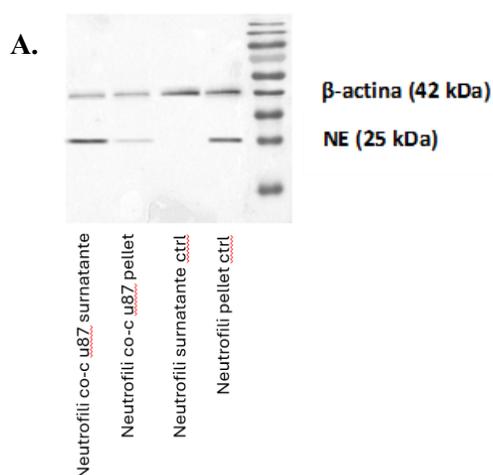


FIGURA 22. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di NE rapportata con la β -actina delle U87-MG (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di NE nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

4.2.3 ARG-1

Prendiamo ora in considerazione l'enzima arginasi-1, espressa in quantità costitutivamente elevate dai neutrofili ed immagazzinata all'interno dei loro granuli in forma inattiva. Viene rilasciata in seguito alla secrezione simultanea di diversi granuli citoplasmatici. Sia i ROS, che arginasi-1 nel contesto tumorale sono considerate le due entità apparentemente responsabili dell'effetto immunosoppressivo, in particolare della soppressione dei linfociti T. Per quanto riguarda l'arginasi-1, attraverso la deplezione di L-arginina [47]. Il rilascio di ARG-1 da parte dai neutrofili attivati è stato recentemente associato alla disfunzione delle cellule T in numerose patologie infiammatorie.

È noto da letteratura che IL-8 induce la formazione ed il rilascio extracellulare di granuli di gelatinasi nei polimorfonucleati umani (PMN). Sia IL-8 che il TNF- α ne hanno indotto il rilascio da parte dei neutrofili. Inoltre, è stato dimostrato che la stimolazione combinata con IL-8 e TNF- α ha avuto un effetto additivo sul rilascio di ARG-1, e da un'analisi eseguita sui surnatanti è emerso che entrambe le citochine hanno prodotto una secrezione dose-dipendente da parte dei neutrofili. IL-8 ha un'attività pro-angiogenica, ed è per questo che contribuisce con azione immunosoppressiva alla diffusione del tumore, attraverso l'induzione del rilascio dell'arginasi-1 da parte dei neutrofili [48].

Nel nostro esperimento abbiamo valutato la produzione di ARG-1, da parte dei neutrofili. È emerso che i neutrofili in condizioni basali esprimono in modo ubiquitario l'enzima che in minima parte viene rilasciato nei medium di coltura. Quando i neutrofili vengono coltivati con la linea A375, si osserva una riduzione dei livelli intracellulari di ARG-1, inoltre il quantitativo riscontrato a livello intra ed extra-cellulare è paragonabile (Figura 23).

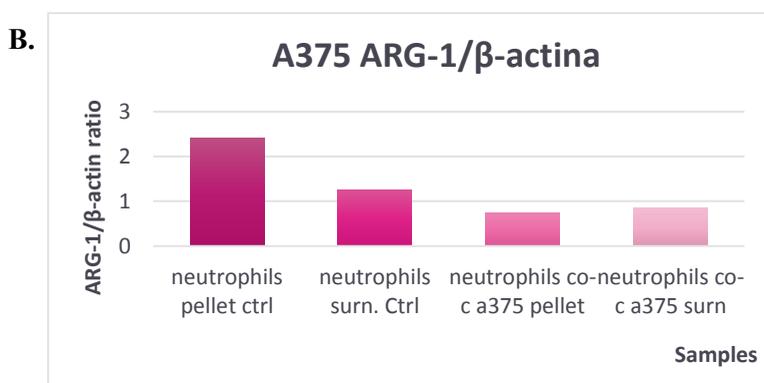
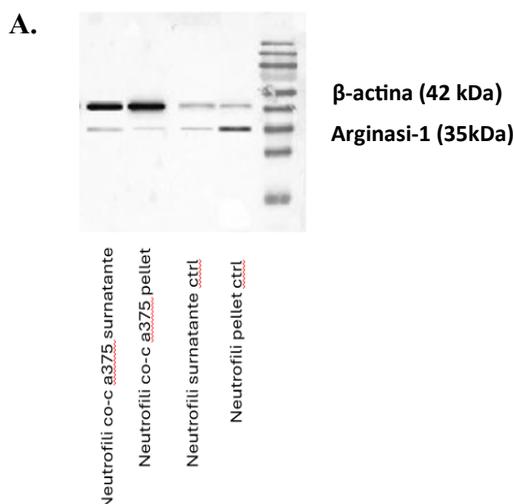


FIGURA 23. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di ARG-1 rapportata con la β -actina delle A375 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di arginasi-1 nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Anche nel caso in cui i neutrofili vengano coltivati in presenza della linea tumorale MDA MB 231 il risultato è simile al precedente (Figura 24). Diversi studi hanno evidenziato un aumento dei livelli di ARG-1 nei neutrofili associati a diversi tumori, i neutrofili di cui noi abbiamo raccolto il pellet sono quelli che sono entrati in contatto solo esternamente con il tumore per cui nonostante guardando i rapporti si osservi un aumento del rilascio di ARG-1 in queste cellule può essere che i segnali non siano sufficienti per indurre un aumento dei livelli di espressione rispetto al controllo. Sarebbe interessante isolare i neutrofili entrati nello sferoide per vedere se in questi vi sia l'up regolazione della ARG-1. Dai dati ottenuti precedentemente sul fenotipo appare evidente che le cellule che penetrano lo sferoide hanno un fenotipo più pronunciato o addirittura diverso rispetto a quelli che rimangono

esternamente suggerendo come il microambiente dello sferoide fornisca stimoli/segnali diversi che possano influenzare la differenziazione dei neutrofili e forse anche la funzione

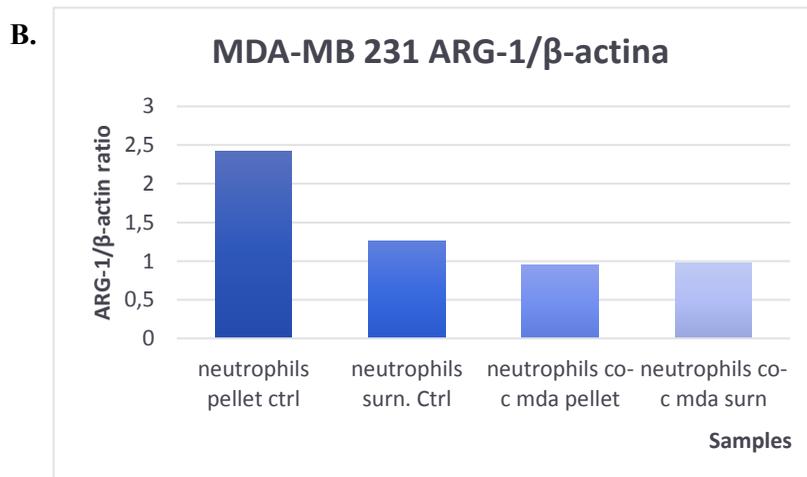
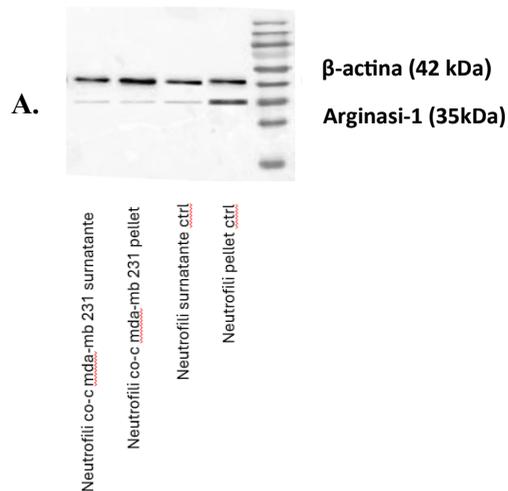


FIGURA 24. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di ARG-1 rapportata con la β -actina delle MDA-MB 231 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione della proteina nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Considerando la linea U87, osserviamo invece un aumento dei livelli di ARG-1 sia nelle cellule che rilasciato nel medium extracellulare se paragonati al controllo (Figura 25). In letteratura, inoltre, è riportato che le anomalie dell'immunità cellulare indotte dall'ictus rispecchiano quelle osservate nei pazienti con tumori cerebrali maligni, nei quali è stato recentemente identificato un nuovo asse di

immunosoppressione periferica che include il rilascio di ARG-1 dai neutrofili attivati circolanti [49].

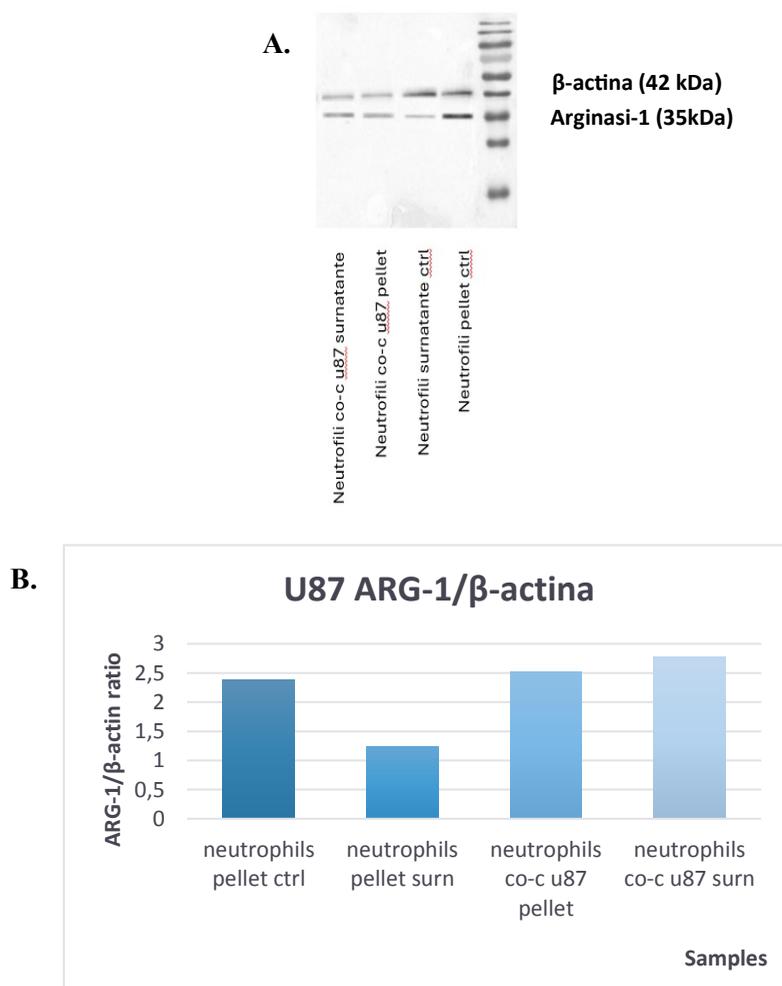


FIGURA 25. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di ARG-1 rapportata con la β-actina delle U87-MG (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di arginasi-1 nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

4.2.4 eNAMPT

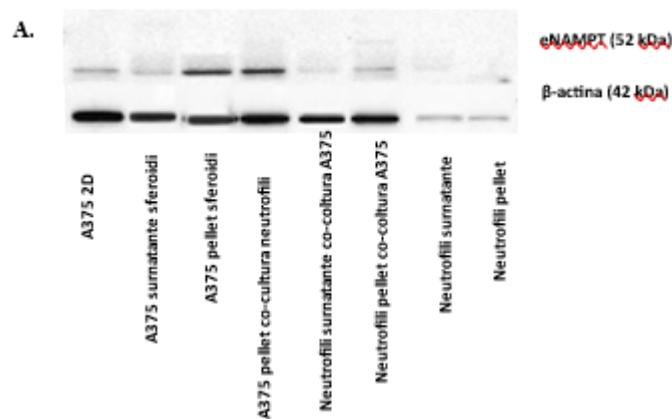
Nel tentativo di andare ad identificare un possibile meccanismo coinvolto nelle alterazioni riscontrate sia fenotipicamente che funzionalmente, abbiamo iniziato a valutare il coinvolgimento della nicotinammide fosforibosiltrasferasi (NAMPT). Di NAMPT ne esistono due forme una extracellulare (eNAMPT), che svolge funzione di citochina ed una intracellulare (iNAMPT), un enzima chiave nel metabolismo del NAD. Alti livelli di eNAMPT circolante sono stati associati con severi disordini

metabolici e infiammatori, tra cui il cancro. La NAMPT intracellulare è una fosforibosiltransferasi omodimerica di tipo II, responsabile di catalizzare la produzione di nicotinammide mononucleotide (NMN) da nicotinammide (vitamina B3 o vitamina PP) e fosforibosil pirofosfato (PRPP), la reazione limitante la velocità nella via per la biosintesi del NAD. È tramite questa attività catalitica che iNAMPT regola i valori intracellulari di NAD. Gli studi condotti su eNAMPT rilasciata dalle cellule tumorali sono relativamente recenti e mostrano come può essere secreto dalla maggior parte, se non da tutte, le linee cellulari tumorali studiate. Uno studio suggerisce come, nelle linee cellulari di melanoma non stimolate, l'abbondanza relativa della forma extracellulare è circa l'1% del NAMPT totale [38]. Tuttavia, ciò deve essere confermato anche dopo la stimolazione, poiché stabilirebbe un collegamento quantitativo tra il livello bioenergetico intracellulare e la segnalazione extracellulare. Nonostante gli studi condotti su questa proteina, il meccanismo di come venga secreta eNAMPT non è stato ancora particolarmente chiarito per cui saranno necessarie ulteriori ricerche in quest'ambito. Recentemente è stato osservato come la eNAMPT sia in grado di indurre un fenotipo particolare nei neutrofili CXCR4⁺CD62L^{low} che, per l'espressione elevata di CXCR4 tipica dei neutrofili che ritornano al midollo per essere eliminati terminato il loro ciclo vitale, vengono chiamati Naged. I neutrofili stimolati da eNAMPT vanno anche incontro ad un tipo di NETosi vitale caratterizzata dall'attivazione della sirtuina 1 [50].

I neutrofili sono in grado di produrre e rilasciare NAMPT, quando attivati, come è stato osservato durante l'infarto del miocardio, piuttosto che nelle infezioni delle vie aeree, e principalmente in contesti pro-infiammatori. Recentemente è stata dimostrata la up-regolazione della iNAMPT nei TAN in un modello animale di melanoma e che questa up-regolazione sia importante per lo sviluppo del fenotipo protumorale (Guimaraes-Bastos 2022 journal of leucocyte biology). Infatti, l'inibizione di iNAMPT mediante il trattamento con l'inibitore FK866 ha determinato la conversione dei neutrofili protumorali in antitumorali. Tali neutrofili, quando trasferiti adottivamente in topi portatori di tumore, sopprimono efficacemente la vascolarizzazione e la crescita del tumore in questi animali. Si può quindi ipotizzare che questo approccio nei neutrofili umani potrebbe fornire un'opzione terapeutica valida per i pazienti affetti da cancro

Lo stesso aumento dei livelli di espressione è stato osservato nei neutrofili dei pazienti affetti da melanoma e nei pazienti affetti da tumore testa-collo. Differentemente in una situazione basale la produzione e il rilascio sono nulli come si può osservare nei neutrofili di controllo. Differentemente le cellule tumorali spesso producono e rilasciano NAMPT avente diverse funzioni immunoregolarie. Come si può osservare dall'analisi dei dati presenti in figura (Figura 26), le cellule A375 di melanoma producono NAMPT e tale produzione aumenta notevolmente quando le stesse cellule vengono cresciute in 3D; questo potrebbe essere dovuto allo sviluppo del centro ipossico (Figura 26). È stato dimostrato come il fattore HIF2 α sia responsabile dell'up-regolazione dei livelli di NAMPT nell'osteoartrite e nella linea HEP-G2 di carcinoma epatico.

Il livello di NAMPT intracellulare invece, non viene modificato quando gli sferoidi di A375 vengono coltivati insieme ai neutrofili mentre si osserva invece una riduzione dei livelli di NAMPT nei rispettivi surnatanti. Dato interessante è un aumento dei livelli di NAMPT intracellulare nei neutrofili co-coltivati con gli sferoidi. Come riportato precedentemente, diversi stimoli possono modulare i livelli di NAMPT nei neutrofili. Da letteratura è stato dimostrato che gli interferoni di tipo I innescano l'attività antitumorale dei neutrofili e l'assenza di IFN supporta l'attivazione tumorigenica di queste cellule. In assenza di IFN- β endogeno, la produzione sistemica del G-CSF, è altamente up-regolata. G-CSF (CSF3) è un potente modulatore dell'attività dei neutrofili, ed è stato dimostrato un coinvolgimento importante da parte di NAMPT nella via di segnalazione di questo fattore. Il deficit di IFN di tipo I è associato alla sovraregolazione della via di segnalazione NAMPT. Ulteriori studi sono necessari per capire quale sia il fattore che induce questo aumento nei neutrofili [51].



B.

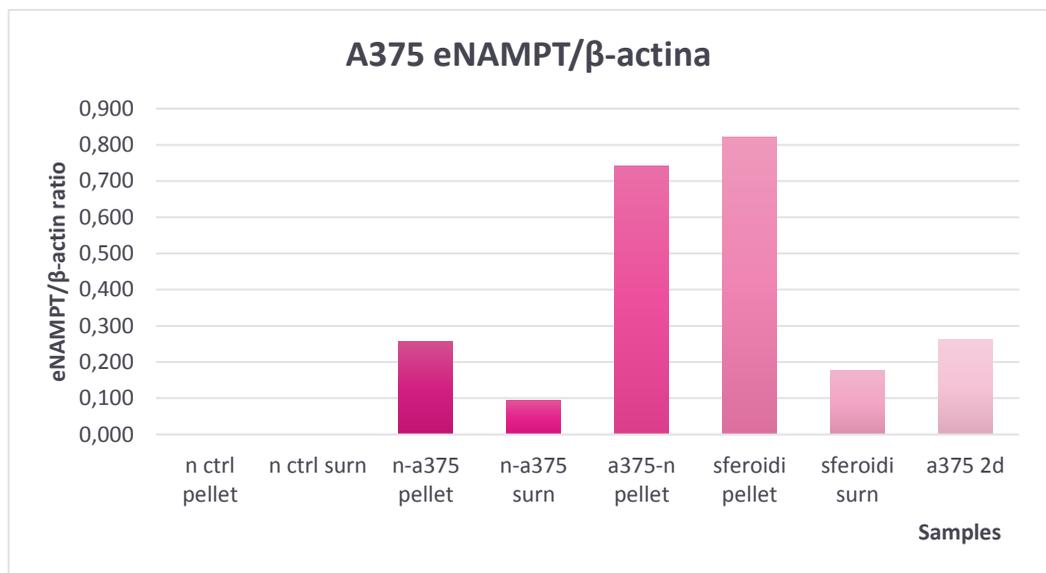


FIGURA 26. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di eNAMPT in rapporto con la β-actina delle A375 (A). Il grafico è rappresentativo della quantificazione dell'espressione di eNAMPT nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Quando vengono prese in considerazione le cellule di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB 231 si osservano bassi livelli di NAMPT intracellulari ed elevati livelli nel surnatante degli sferoidi. Negli sferoidi coltivati con i neutrofili invece si osserva ad un aumento dei livelli di NAMPT intracellulare e una notevole riduzione dei livelli extracellulari. Dati di letteratura suggeriscono che diversi stimoli possono modulare la release di NAMPT in senso positivo e negativo, è quindi probabile che i neutrofili possano rappresentare mediante qualche recettore/mediatore uno di questi stimoli. Saranno necessari ulteriori studi per

cercare di chiarire questo punto. Differentemente dal modello precedente nessun aumento di espressione è stato osservato nei neutrofili coltivati con le cellule tumorali (Figura 27).

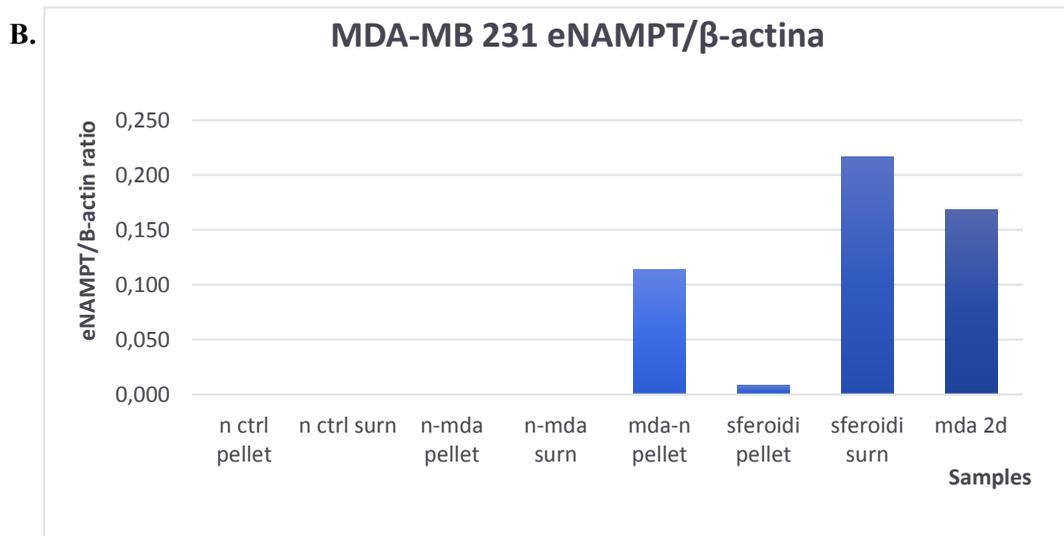
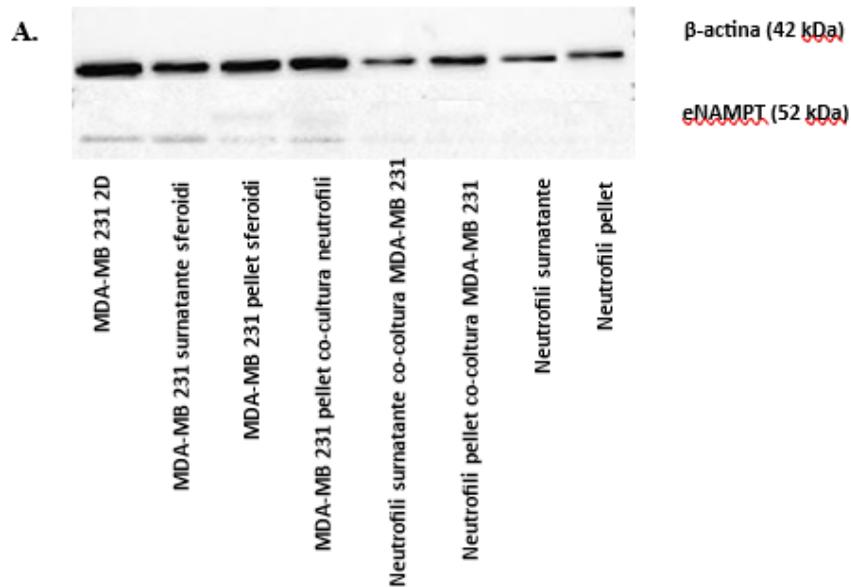
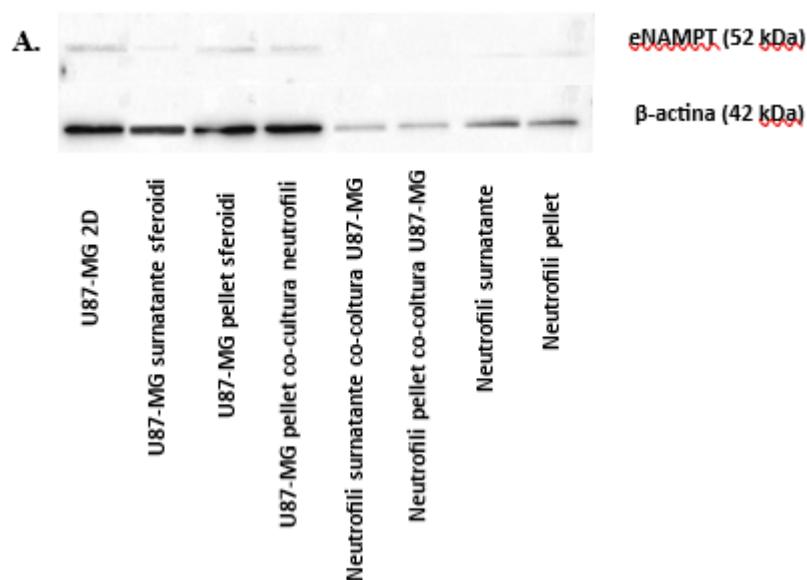


FIGURA 27. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di eNAMPT in rapporto con la β -actina delle MDA-MB 231 (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione di proteina nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

Infine, quando prendiamo in esame la linea di glioblastoma possiamo vedere come il modello 2D delle cellule U87 MG esprimano alti livelli di iNAMPT nel citoplasma, che si mantiene nel modello 3D ma che viene poi notevolmente ridotto, circa la metà, nelle cellule coltivate con i neutrofili. Nel nostro modello analizzato tramite western blot è stato possibile osservare NAMPT solo in una debole banda corrispondente alla eNAMPT (Figura 28). Essendo riportato in letteratura che le cellule U87 MG, oltre ad esprimere alti livelli intracellulari rilasciano anche discreti livelli di eNAMPT cercheremo di modificare le condizioni sperimentali per vedere se queste possono eventualmente inficiare il risultato ottenuto. Ulteriori studi a tempi diversi e concentrando ulteriormente il surnatante aiuteranno a spiegare questo dato. Altro aspetto che vorremmo indagare è la possibilità che la eNAMPT prodotta dalle cellule dello sferoide rimanga intrappolata al suo interno. Infatti, tra i diversi modelli quello ottenuto con le cellule U87 MG è quello in cui lo sferoide è più compatto e di difficile disgregazione.



B.

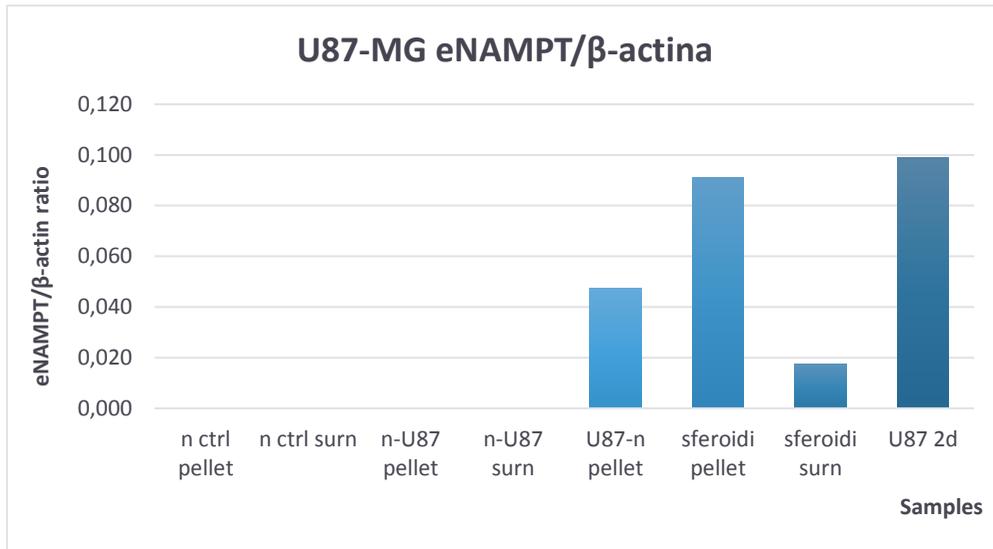


FIGURA 28. Immagine ottenuta mediante analisi western blot, relativa all'espressione di eNAMPT rapportata con la β -actina delle U87-MG (A). Grafico rappresentativo della quantificazione dell'espressione dell'enzima nei campioni analizzati. I valori si riferiscono all'esperimento riportato (B).

5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In conclusione, i risultati presentati in questo elaborato di tesi hanno mostrato come tumori diversi possano influenzare differientemente la produzione e il rilascio dei mediatori caratteristici dei neutrofili, sottolineando come queste cellule siano altamente plastiche riuscendo a rispondere in modo variabile a stimoli diversi.

In particolare, se consideriamo gli effetti indotti dalla linea di melanoma A375 non si osserva un aumento dei livelli di MMP-9 né intracellulare né rilasciata, e neanche un aumento dei livelli di ARG-1, ma solo del rilascio di NE. Questo dato ci porta ad ipotizzare che sia necessario un contatto diretto come quello che i neutrofili ottengono all'interno dello sferoide per ottenere una differenziazione funzionale, cosa che vorremmo approfondire.

Se consideriamo le MDA-MB 231, linea di carcinoma mammario triplo negativo altamente invasivo e metastatizzante, osserviamo un aumento dei livelli di MMP-9 rilasciata in co-cultura con i neutrofili a suggerire il loro reclutamento per favorire la vascolarizzazione e metastatizzazione caratteristica di questo tumore. Il rilascio di NE indotta nei neutrofili potrebbe ulteriormente favorire il processo di vascolarizzazione o essere associato a NETosi il cui ruolo nello sviluppo di metastasi è stato ampiamente studiato. Mentre l'ARG-1 potrebbe partecipare al ruolo immunosoppressivo.

Infine, se consideriamo la linea di glioblastoma U87 MG, si osserva una bassa produzione e rilascio di MMP-9 che potrebbe essere giustificata dal fatto che i glioblastomi sono ritenuti scarsamente metastatizzanti. Mentre risultano alti i livelli di NE che anche in questo caso potrebbe essere associata al processo di vascolarizzazione o allo sviluppo di NETosi ampiamente osservata in questo tipo di tumore con probabile funzione di protezione tumorale dal riconoscimento del sistema immunitario e promozione del fenotipo aggressivo. L'aumento dei livelli di ARG-1 prodotta e rilasciata confermerebbe un ruolo primario dei neutrofili nell'immunosoppressione in questo tipo di tumore.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nicholson, Lindsay B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry* vol. 60,3: 275-301.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Cellular and molecular immunology. IX Ed.
3. Chhikara, B. S., & Parang, K. (2023). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451.
4. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (1), 57-70.
5. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 12 (1): 31-46.
6. Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 21 (2), 137-148.
7. Dunn, Gavin P., Allen, T Bruce., Hiroaki Ikeda., Old, L. J., Schreiber, Robert D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* vol. 3,11: 991-8.
8. Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 13 (3), 159-75.
9. Kyle J. Eash, Adam M. Greenbaum, Priya K. Gopalan, and Daniel C. Link. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *The Journal of clinical investigation* vol. 120,7: 2423-31.
10. Tsioumpekou M, Krijgsman D, Leusen JHW, Olofsen PA. (2023). The Role of Cytokines in Neutrophil Development, Tissue Homing, Function and Plasticity in Health and Disease *Cells*; 12(15):1981.
11. Michael P. Collins, John T. Kissel. (2005). *Peripheral Neuropathy*. IV Ed.
12. Carnevale, S., Ghasemi, S., Rigatelli, A., and Jaillon, S. (2020). The complexity of neutrophils in health and disease: Focus on cancer. *Semin Immunol*. 48, 101409.

13. Nordenfelt, Pontus, and Hans Tapper. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology* vol. 90,2: 271-84.
14. Marfa Blanter, Mieke Gouwy, Sofie Struyf. (2021). Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors. *Journal of inflammation research* vol. 14 141-162.
15. Jaillon, S., Galdiero, M. R., Del Prete, D., Cassatella, M. A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 35, 377- 394.
16. Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S. and Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGFbeta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 16, 183-194.
17. Morgan A. Giese, Laurel E. Hind, Anna Huttenlocher. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood;* 133 (20): 2159–2167.
18. Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res.* 2015, 983698.
19. Alvaro Teijeira, Saray Garasa, Maria C. Ochoa, Maria Villalba, Irene Olivera, Assunta Cirella, Iñaki Eguren-Santamaria, Pedro Berraondo, Kurt A. Schalper, Carlos E. de Andrea, Miguel F. Sanmamed, Ignacio Melero. (2021). IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and Immunotherapy. *Clin Cancer Res;* 27 (9): 2383–2393.
20. Shaul, Merav E., and Zvi G. Fridlender. (2017). Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *Journal of leukocyte biology* 102.2: 343-349.
21. Hajizadeh F, Aghebati Maleki L, Alexander M, Mikhailova MV, Masjedi A, Ahmadpour M, Hashemi V, Jadidi-Niaragh F. (2021). Tumor-associated neutrophils as new players in immunosuppressive process of the tumor microenvironment in breast cancer. *Life Sci.* 1; 264:118699.
22. Sionov, R. V., Fridlender, Z. G., and Granot, Z. (2015). The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 8, 125-158.

23. Wculek, S. K., and Malanchi, I. (2019). Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 528, 413-417.
24. Huh, S. J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C., and Robertson, G. P. (2010). Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res*. 70, 6071-82.
25. Furumaya, C., Martinez-Sanz, P., Bouti, P., Kuijpers, T. W., and Matlung, H. L. (2020). Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Frontiers in Immunology*. 11, 1664-3224.
26. Brandau, S., Dumitru, C.A., and Lang, S. (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol*. 35, 163-176.
27. Peishan Li, Ming Lu, Jiayuan Shi, Li Hua, Zheng Gong, Qing Li, Leonard D Shultz, Guangwen Ren. (2020). Dual roles of neutrophils in metastatic colonization are governed by the host NK cell status. *Nat Commun* 11, 4387.
28. Jonathan Cools-Lartigue, Jonathan Spicer, Braedon McDonald, Stephen Gowing, Simon Chow, Betty Giannias, France Bourdeau, Paul Kubes, Lorenzo Ferri. (2013). The Journal of Clinical Investigation in The American Society for Clinical Investigation. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis, 123, 3446-3458.
29. Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., and Jorcyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer research*. 65, 8896-8904.
30. Kalafati, L., Mitroulis, I., Verginis, P., Chavakis, T., and Kourtzelis, I. (2020). Neutrophils as Orchestrators in Tumor Development and Metastasis Formation. *Frontiers in Oncology*. 20, 581457.
31. Wenxing Hu, Serene M L Lee, Alexandr V Bazhin, Markus Guba, Jens Werner, Hanno Nieß. (2023). Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *J Cancer Res Clin Oncol* 149, 2191–2210.
32. Xiong, S., Dong, L., and Cheng, L. (2021). Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *J Hematol Oncol*. 14, 173.

33. Jitka Y. Sagiv, Janna Michaeli, Simaan Assi, Inbal Mishalian, Hen Kisos, Liran Levy, Pazzit Damti, Delphine Lumbroso, Lola Polyansky, Ronit V. Sionov, Amiram Ariel, Avi-Hai Hovav, Erik Henke, Zvi G. Fridlender, Zvi Granot. (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Reports* 10, 562–573.
34. Powell DR, Huttenlocher A. (2016). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*; 37(1):41-52.
35. Bassiouni, W., Ali, M. A. M. and Schulz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* 288, 7162-7182.
36. Banerji, Aniruddha & Das, Shamik & Amitava, Chatterjee. (2008). Culture of Human A375 Melanoma Cells in the Presence of Fibronectin Causes Expression of MMP-9 and Activation of MMP-2 in Culture Supernatants. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer.* 27. 135-45. 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v27. i2.60.
37. Elena Revuelta-López, José Castellano, Santiago Roura, Carolina Gálvez-Montón, Laura Nasarre, Sonia Benitez, Antoni Bayes-Genis, Lina Badimon and Vicenta Llorente-Cortés. (2013). Hypoxia Induces Metalloproteinase-9 Activation and Human Vascular Smooth Muscle Cell Migration Through Low-Density Lipoprotein Receptor–Related Protein 1–Mediated Pyk2 Phosphorylation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*; 33:2877–2887.
38. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. (2017). The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett*; 14(5):5865-5870.
39. Forkasiewicz A, Stach W, Wierzbicki J, Stach K, Tabola R, Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K. (2022). Effect of LDHA Inhibition on TNF- α -Induced Cell Migration in Esophageal Cancers. *Int J Mol*;23(24):16062.

40. Deryugina EI, Zajac E, Juncker-Jensen A, Kupriyanova TA, Welter L, Quigley JP. (2014). Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *Neoplasia*;16(10):771-88.
41. Bekes EM, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Zajac E, Ardi VC, Quigley JP, Deryugina EI. (2011). Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am J Pathol.*;179(3):1455-70.
42. Irina Lerman, Stephen R. Hammes. (2018). Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids*; vol. 133, 96-101.
43. Barry R, Ruano-Gallego D, Radhakrishnan ST, Lovell S, Yu L, Kotik O, Glegola-Madejska I, Tate EW, Choudhary JS, Williams HRT, Frankel G. (2019). Faecal neutrophil elastase-antiprotease balance reflects colitis severity. *Mucosal Immunol*;13(2):322-333.
44. Kimura T, Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Ito D, Nagumo M. (2003). Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *Int Immunopharmacol*;3(10-11):1519-28.
45. Mittendorf EA, Alatrash G, Qiao N, Wu Y, Sukhumalchandra P, St John LS, Philips AV, Xiao H, Zhang M, Ruisaard K, Clise-Dwyer K, Lu S, Molldrem JJ. (2012). Breast cancer cell uptake of the inflammatory mediator neutrophil elastase triggers an anticancer adaptive immune response. *Cancer Res*;72(13):3153-62.
46. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. (2003). Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. 10;107(22):2829-36.
47. Zhang, Huajia, Zhu, Xiaodong, Friesen, Travis J., Kwak, Jeff W., Pisarenko, Tatyana, Mekvanich, Surapat, Velasco, Mark A., Randolph, Timothy W., Kargl, Julia Houghton, A. McGarry. (2022). Annexin A2/TLR2/MYD88 pathway induces arginase 1 expression in tumor-associated neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation- J Clin Invest*. 0021-9738; vol. 132, 22.

48. Rotondo R, Barisione G, Mastracci L, Grossi F, Orenco AM, Costa R, Truini M, Fabbi M, Ferrini S, Barbieri O. (2009). IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 15;125(4):887-93.
49. Sippel TR, Shimizu T, Strnad F, Traystman RJ, Herson PS, Waziri A. (2015). Arginase I release from activated neutrophils induces peripheral immunosuppression in a murine model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.*;35(10):1657-63.
50. Grolla AA, Travelli C, Genazzani AA, Sethi JK. (2016). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br J Pharmacol*. 173(14):2182-94.
51. Pylaeva E, Harati MD, Spyra I, Bordbari S, Strachan S, Thakur BK, Höing B, Franklin C, Skokowa J, Welte K, Schadendorf D, Bankfalvi A, Brandau S, Lang S, Jablonska J. (2019). NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils. *Int J Cancer*. 1;144(1):136-149
- Audrito V, Messina VG e Deaglio S. (2020). NAMPT e NAPRT: due enzimi metabolici con ruoli chiave nell'infiammazione. *Davanti. Oncol*. 10:358.

7. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Dott.ssa Silvia Fallarini, mia relatrice, che con passione, dedizione e positività mi ha accompagnata e guidata alla fine di questo percorso, concludendolo al meglio.

A mia mamma Silvia. Un “grazie” sarebbe riduttivo per quantificare tutto quello che fai e hai fatto per me in questi anni. Sei il mio esempio di vita, perché si sa, le mamme sono speciali e tu per me hai un valore inestimabile. A mio papà Marcello. A modo tuo papi hai sempre cercato di spronarmi a fare di più, ad ottenere il massimo, solo per il mio bene. Ad oggi posso dire di averlo capito, perché so che sei fiero di me. A mio fratello Matteo. Ti ringrazio perché con la tua simpatia e spontaneità hai sempre cercato un modo per tirarmi su nei momenti bui, come spero di aver fatto e continuare a fare con te, perché il bene che ti voglio è davvero profondo. Tu ed io siamo come cane e gatto, ma con lo stesso modo di camminare.

Grazie a te, Giacomo, perché da tanti anni sei diventato parte fondamentale della mia quotidianità. Per tutte le volte in cui sono caduta e tu eri lì, accanto a me, anche se stanco, anche se dovevi studiare; per tutte le volte in cui ho gioito, tu c’eri. Proprio per questo oggi, voglio regalarti il mio grazie più sincero. Grazie per farmi vivere sempre tutto con il sorriso, grazie per essere al mio fianco e grazie per questo tempo vissuto insieme. Non vedo l’ora di accogliere il futuro con te.

Grazie a mia nonna Giovanna, per tutti i pomeriggi passati a casa tua a fare merenda, chiacchierando, ridendo e a confidarci. Sei preziosa e unica. Vorrei ringraziare mio nonno Elvio, mancato sei anni fa, perché in ogni mio giorno c’è e ci sarà sempre un pensiero rivolto a te. Oggi vorrei vederti sorridere lassù in cielo. Un grazie infinito va inoltre ai miei nonni paterni, Nene e Giorgio, mi avete coccolato tanto da bambina e ancora di più adesso, in un’altra forma, ma i tuoi pranzetti nonna sono rimasti tali e le partite a carte anche, nonno sei imbattibile.

Grazie alla mia amica Rebecca, tutto quello che vorrei dirti lo sai già, quanto tu sia essenziale nella mia vita; dal primo incontro in prima elementare sono passati tanti anni, eppure non ci siamo mai lasciate, sei speciale amica mia.

Grazie Alessandra perché sei un’amica rara, schietta e affettuosa quando vuoi tu, ed io ti voglio veramente tanto bene. Ti sei sempre definita la mia fan numero 1... Ecco, devi sapere che io sono sempre stata la tua.

Grazie Federica, la mia omonima, dai tempi del liceo siamo un libro aperto l'una per l'altra; in te trovo sincerità, dolcezza, comprensione sempre e comunque ed opinioni vere senza mai un fondo di giudizio. Sei eccezionale.

Grazie Chiara, compagna fidata di questi cinque anni, in te ho trovato un'amica leale e genuina. Grazie all'esperienza condivisa a Madeira ci siamo unite ancora di più, ad oggi siamo con orgoglio saldamente ancorate l'una nella vita dell'altra.

Vorrei ringraziare tutte le mie amiche e amici che mi hanno accompagnato in questi anni; Francesca, Arianna, Isabella, Diletta, Chiara, Lorenzo, Emanuele ed Alessandro. Voglio che sappiate, ora e per sempre, di avere un posto speciale nel mio cuore.

Grazie alla mia famiglia acquisita, Sabry, Max e Giuli. Con voi mi sento a casa e in voi ho riscoperto quello che vorrei costruire in futuro. Grazie per tutto l'amore e l'armonia che mi avete regalato in questi anni.

Grazie alla mia dottoranda per avermi aiutato nei momenti di incertezza e ai miei compagni di laboratorio per avere condiviso insieme a me questo importante percorso.

Infine, un ultimo grande grazie vorrei dedicarlo a me stessa, per averci creduto, per aver avuto tenacia e grinta, è arrivato ora il momento di stringermi la mano e dire "sono arrivata al traguardo". Mi ritengo soddisfatta e fortunata, di ciò che ho raggiunto, di come l'ho ottenuto e di tutto ciò che ho guadagnato in questi anni. Con questo ricco bagaglio di conoscenze, sono pronta a prendere in mano la mia vita e farne qualcosa di meraviglioso. *To be continued...*