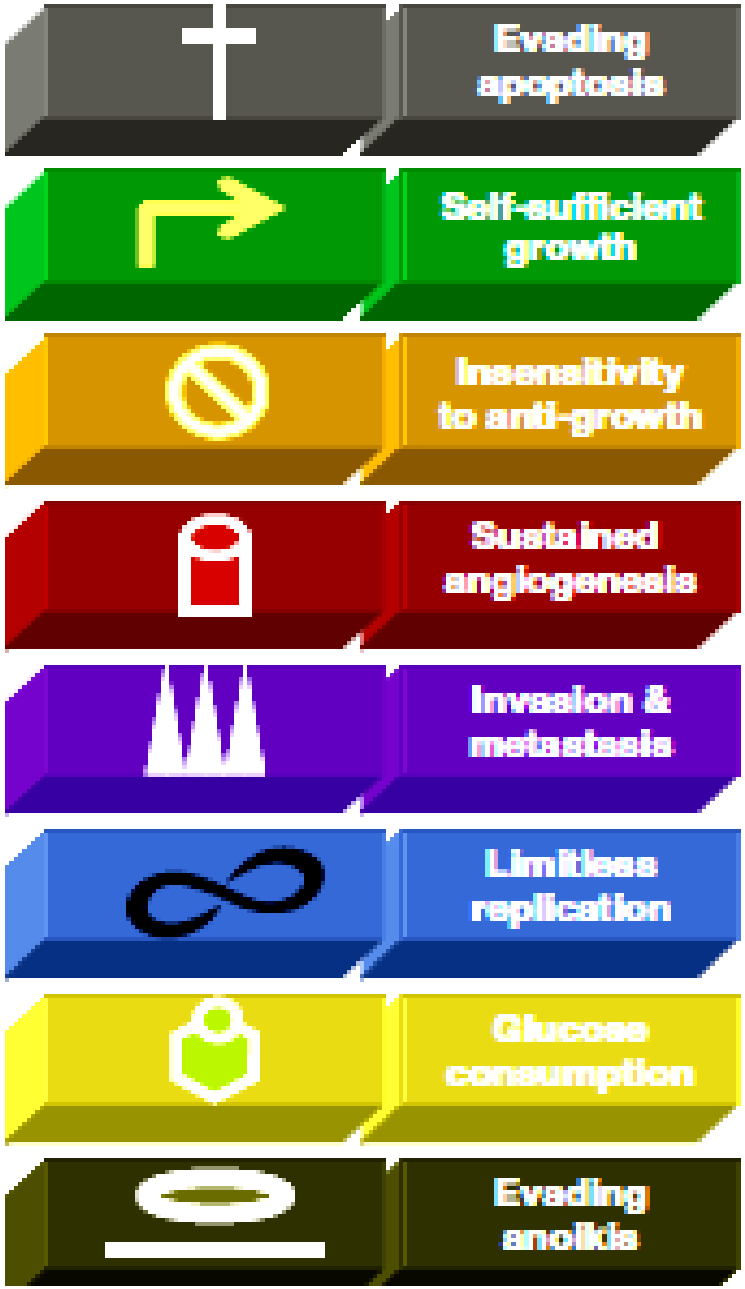
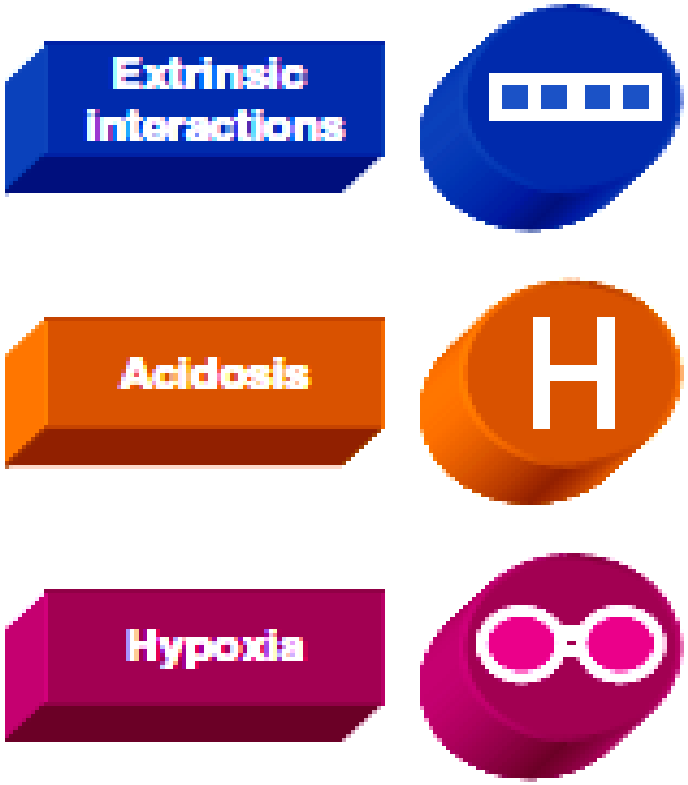
- **La relazione complessa e dinamica tra microambiente e cellule tumorali: metabolismo, angiogenesi e metastasi**

meccanismi cellulari e molecolari

Comuni proprietà fenotipiche delle cellule tumorali

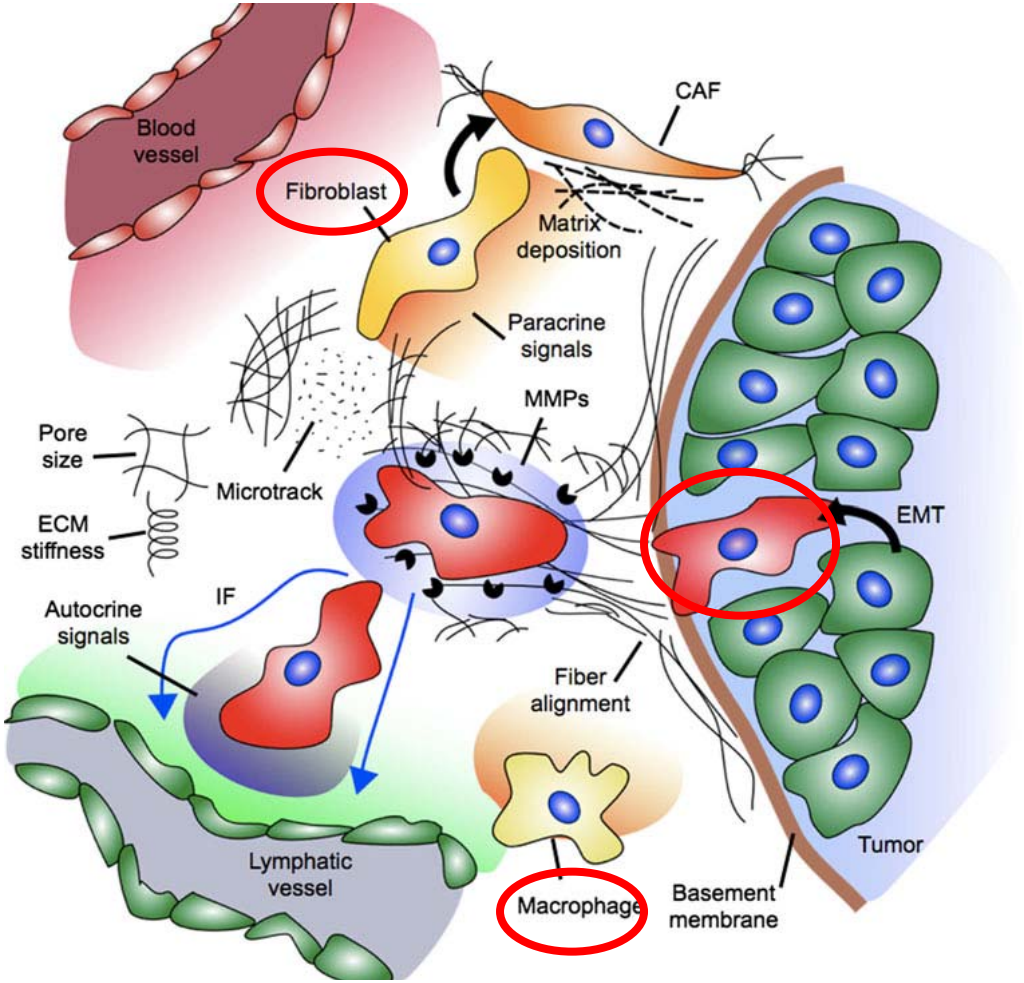


- Le icone e le relative descrizioni sulla sinistra indicano le caratteristiche fenotipiche del cancro. Le tre icone a destra indicano le componenti importanti del microambiente fisiologico che devono essere superate per il progresso dei tumori.



Cancer Metastasis Rev (2007) 26:311–317

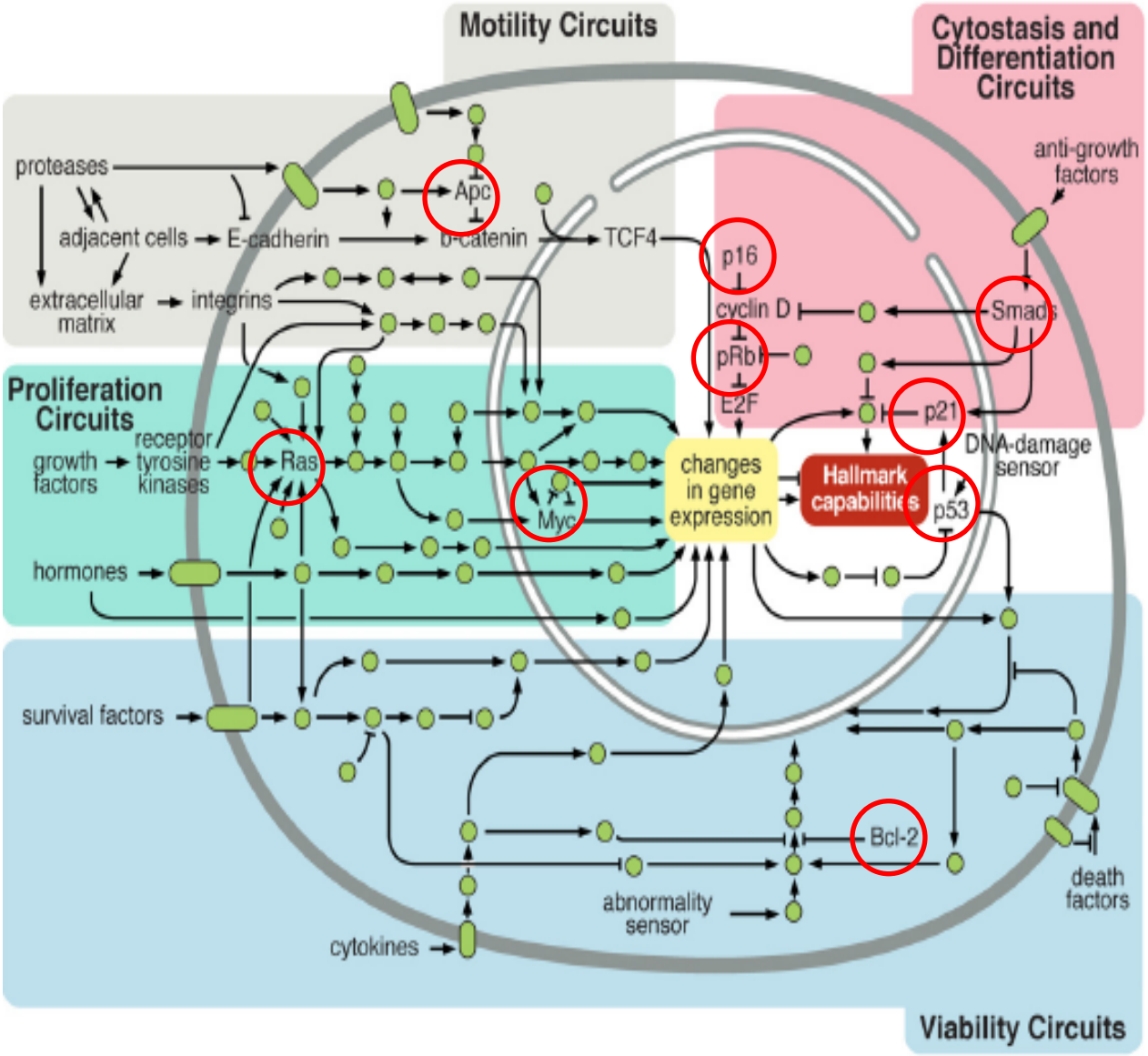
Il microambiente tumorale



Il microambiente tumorale è un componente indispensabile nel processo neoplastico, in quanto favorisce la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la migrazione

W. J. Polacheck et al. Cell. Mol. Life Sci. -1115-1-2012

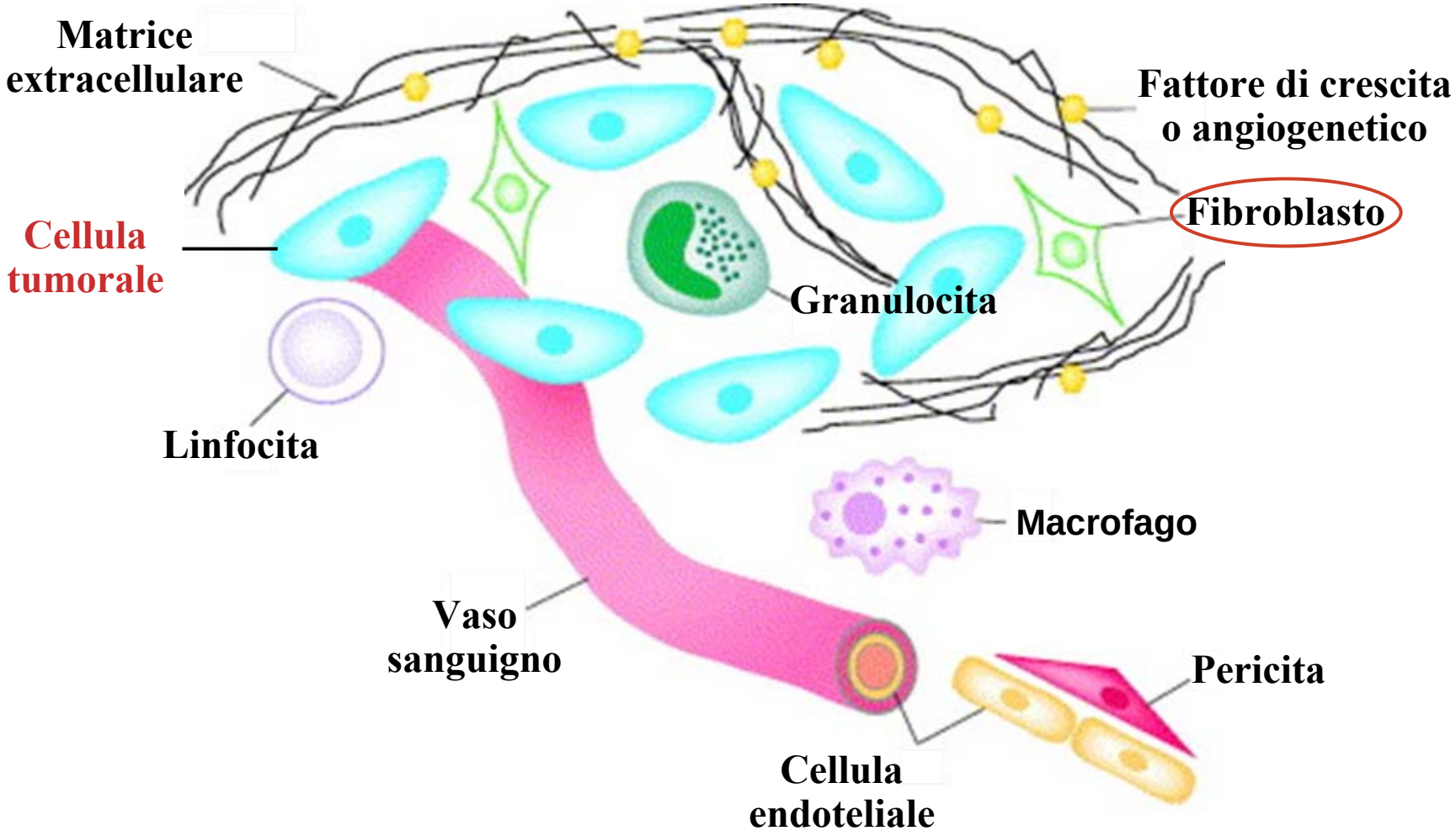
Reti di segnalazione intracellulari



Reti di segnalazione intracellulari

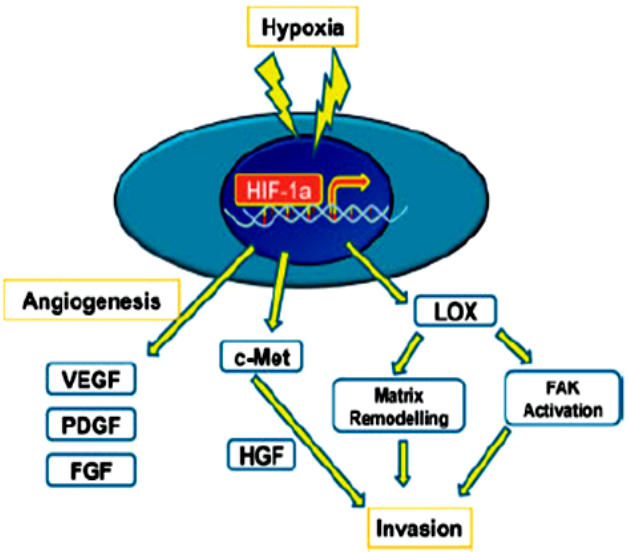
- Una serie di circuiti integrati opera all'interno delle cellule normali e viene riprogrammata per regolare le funzionalità caratteristiche all'interno delle cellule tumorali.
- Sottocircuiti separati, sono raffigurati in campi di colore diverso, sono specializzati per orchestrare le varie capacità.
- Ogni cellula del cancro è esposta ad una miscela complessa di segnali dal suo microambiente, ciascuno di questi sottocircuiti è collegato con i segnali provenienti da altre cellule del microambiente tumorale,

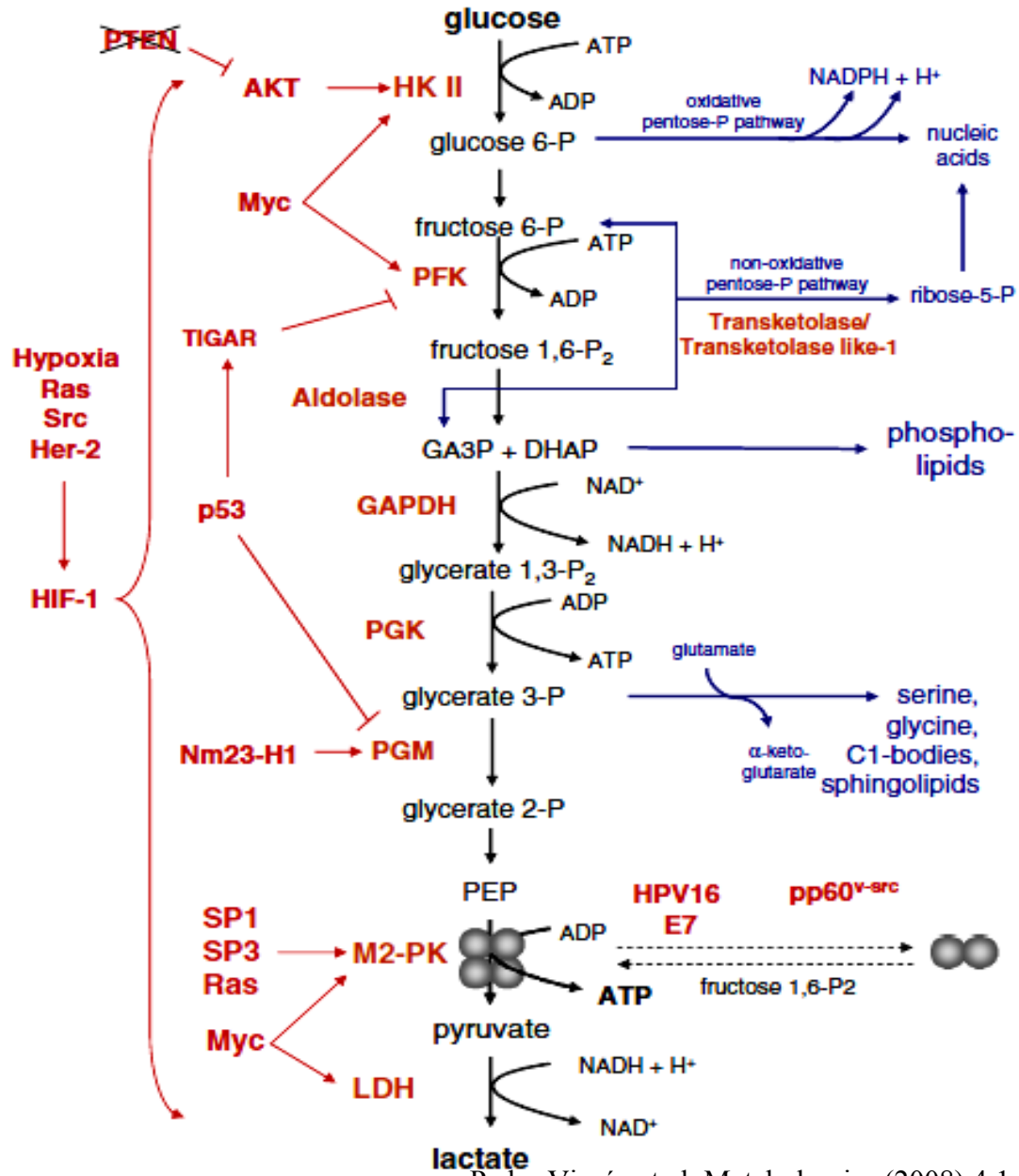
QUALI SONO LE COMPONENTI CELLULARI E MOLECOLARI DEL MICROAMBIENTE TUMORALE?



Adattata da Kammertoens T et al 2005

Effetti di oncogeni, fattori di trascrizione e soppressori tumorali sul metabolismo centrale



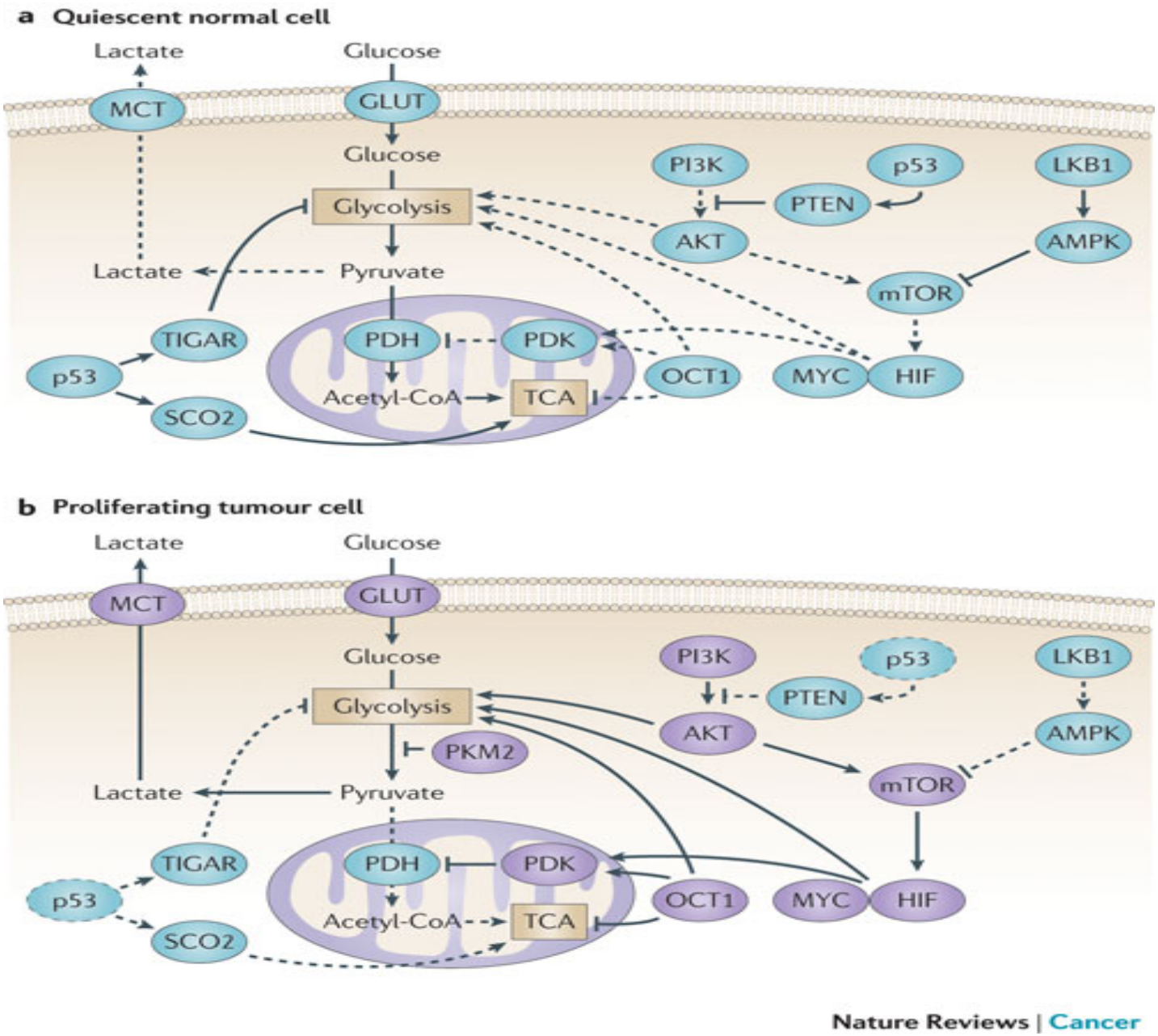


Pedro Viza´n et al. Metabolomics (2008) 4:1–12

Progressione tumorale in condizioni di ipossia

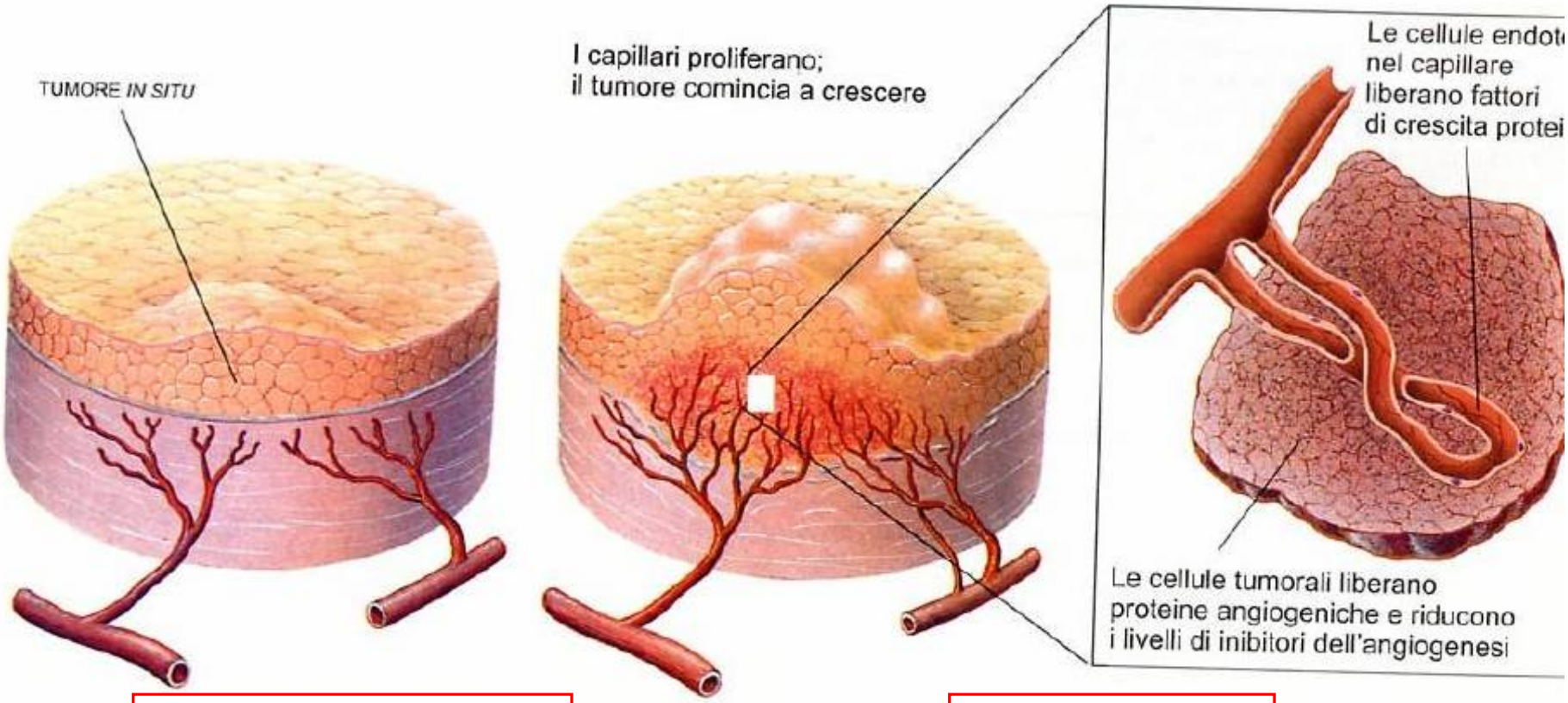
- In condizioni di ipossia uno dei più importanti regolatori ipossia-inducibili è il fattore di trascrizione 1 (HIF-1).
- HIF-1 è costituito da due subunità, HIF-1a e HIF-1b.
- La subunità HIF-1 è regolata in modo ossigeno-dipendente, essendo
  stabile in condizioni di ipossia.
- HIF-1 è un effettore di oncogeni diversi, come Ras, Src o Her-2 e fa aumentare geni di sopravvivenza e fattori di crescita come il fattore di crescita endoteliale (VEGF).
- Allo stesso tempo, HIF-1 aumenta l'espressione di diversi enzimi glicolitici

Meccanismi molecolari che determinano l'effetto Warburg



➢ ANGIOGENESI TUMORALE

Angiogenesi



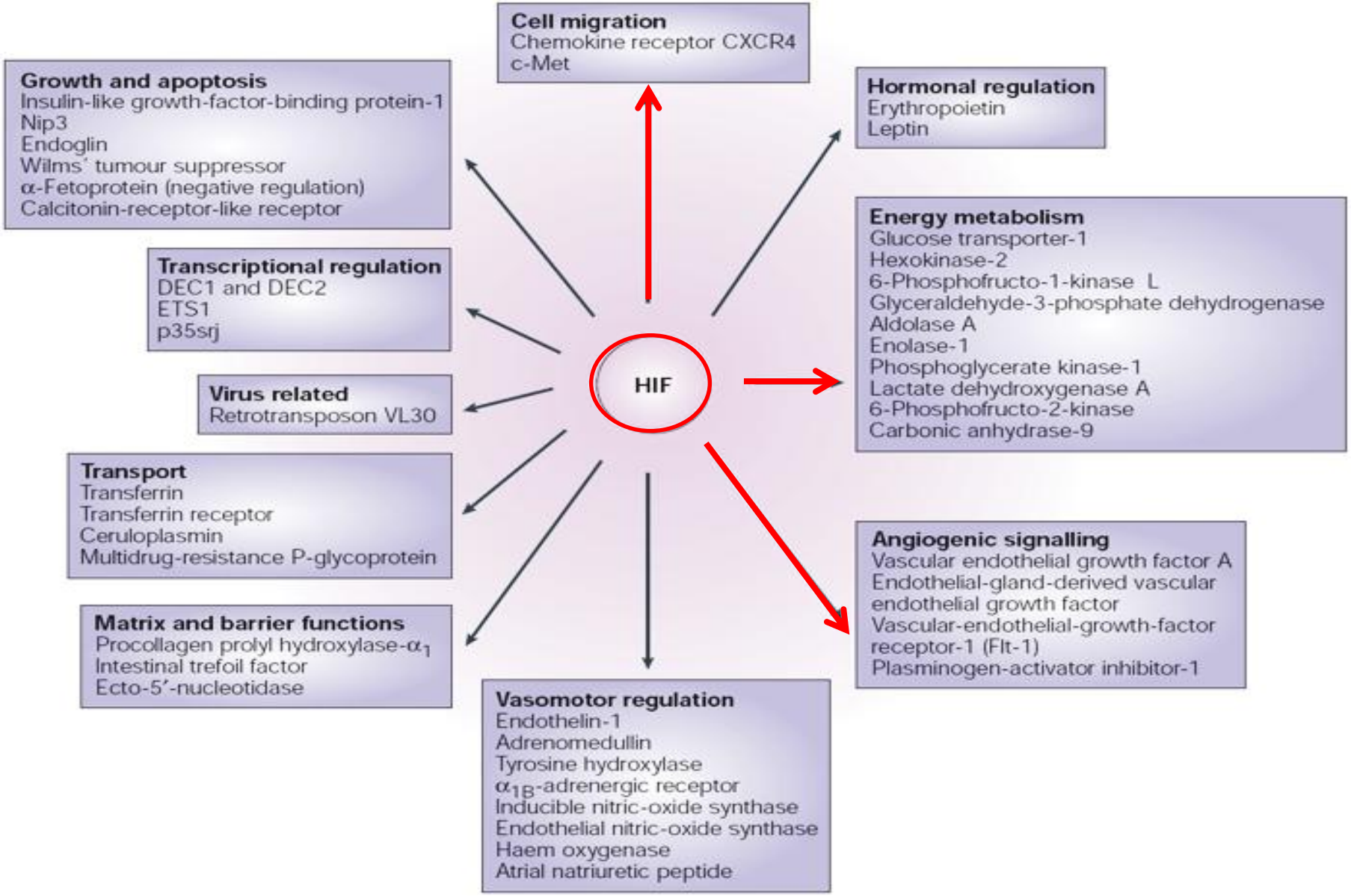
Epigenetic events ⟷ Genetic events

Inhibitors ⟷ **Activators**

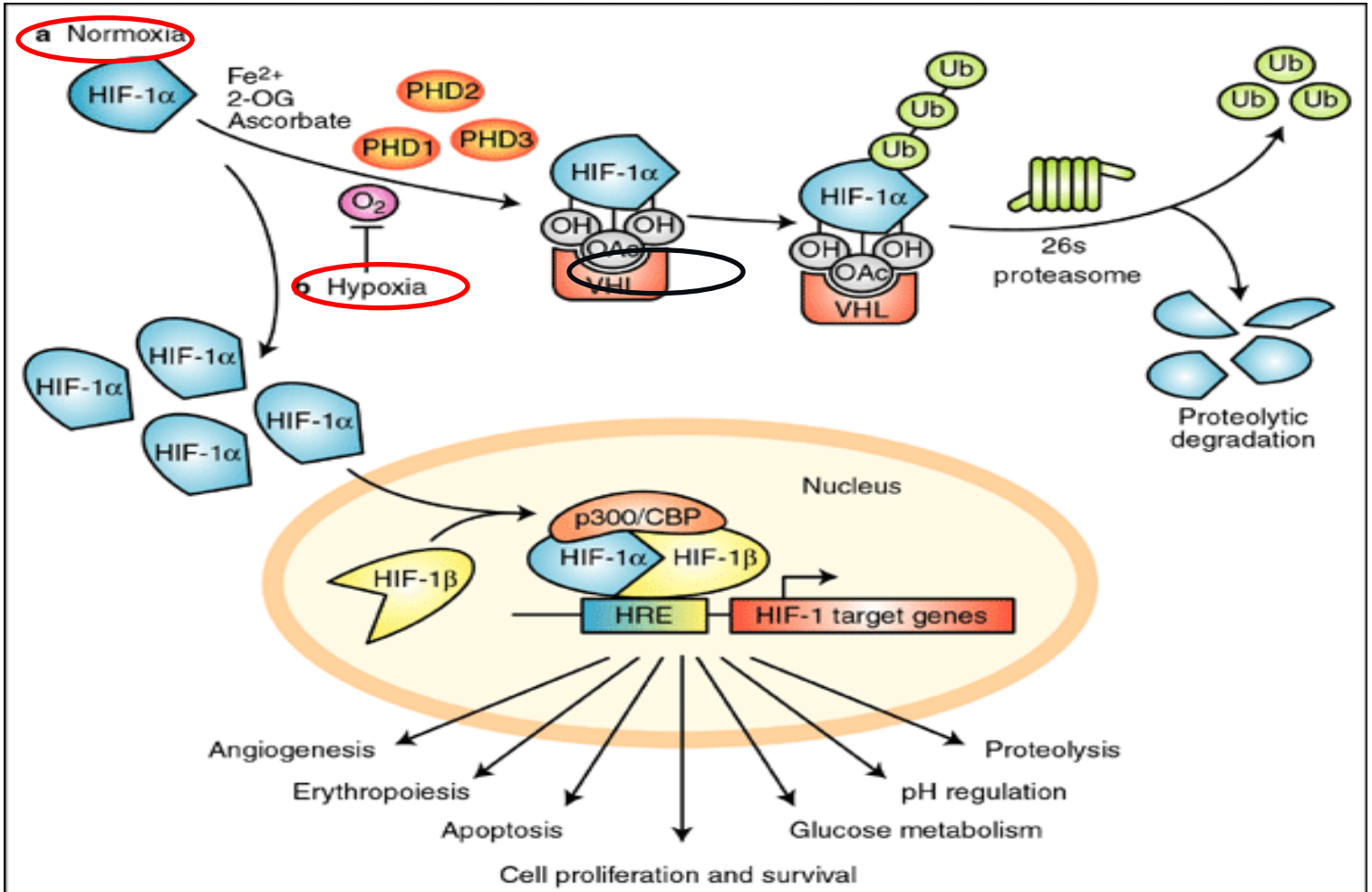
Angiostatin, Endostatin, Estradiol, IL-12, TIMP, TSP-1

Angiogenin, Angiopoietin 1, FGF-2, HGF IL-8, PlGF, VEGF-A

Le funzioni dei circa 150 geni regolati da HIF 1



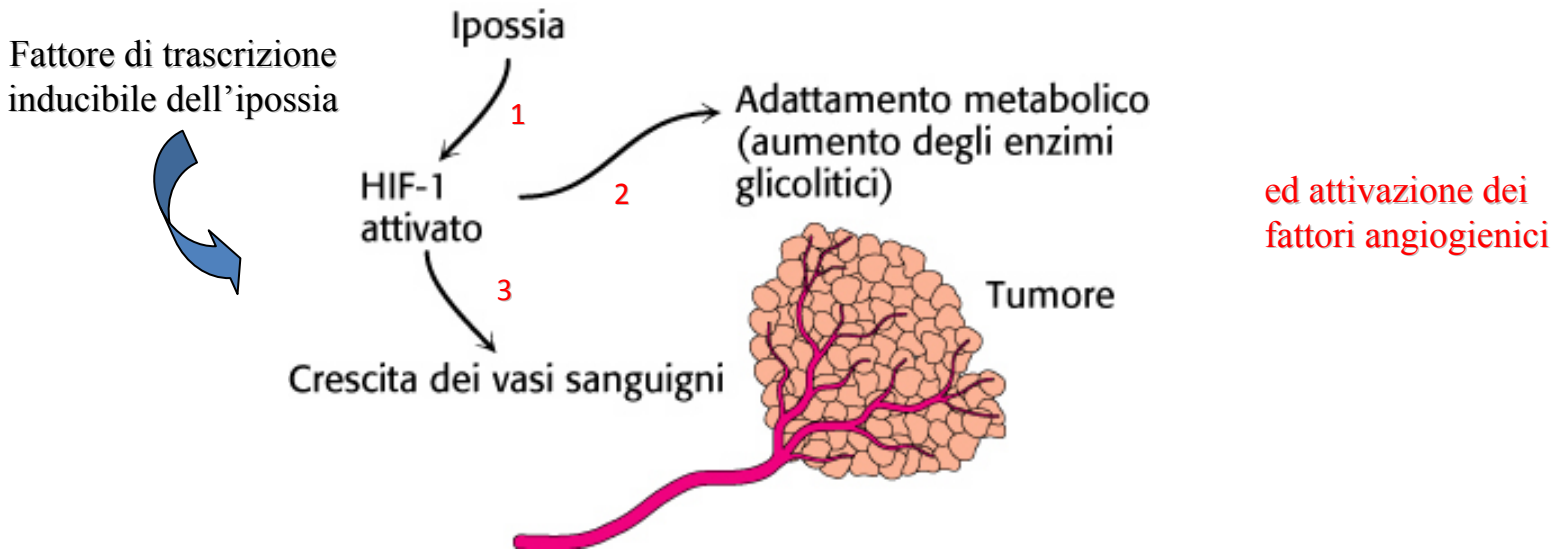
Regolazione del fattore di trascrizione HIF-1



HIF-1α regulation by proline hydroxylation

Expert Reviews in Molecular Medicine 2005 Published by Cambridge University Press

Alterazione dell'espressione genica nei tumori causata dall'ipossia



Le condizioni ipossiche esistenti all'interno di una massa tumorale determinano l'attivazione di HIF-1, che induce l'adattamento metabolico ed attiva i fattori angiogenici che stimolano la crescita di nuovi vasi sanguigni.

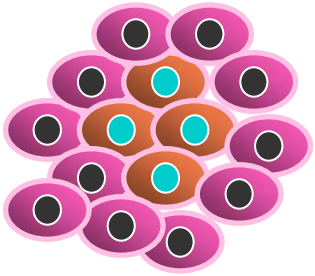
Angiogenesi tumorale

- Quando il tumore supera una certa dimensione la fornitura di ossigeno e nutrienti diventa insufficiente.
- Il tumore continua ad espandersi se compare e viene selezionato un fenotipo angiogenetico ossia delle cellule che producono e secernono citochine mitogeniche (es. VEGF, EGF, uPAR, PDGF, FGF, TGF).
- Oltre alla formazione di nuovi vasi sanguigni si ha il rimodellamento del tessuto connettivo, e si possono avere fenomeni di iperformazione di tessuto fibroso.
- La crescita del tessuto connettivo è indotta da fattori di crescita tra i quali il TGF.

L'angiogenesi è necessaria per la progressione tumorale

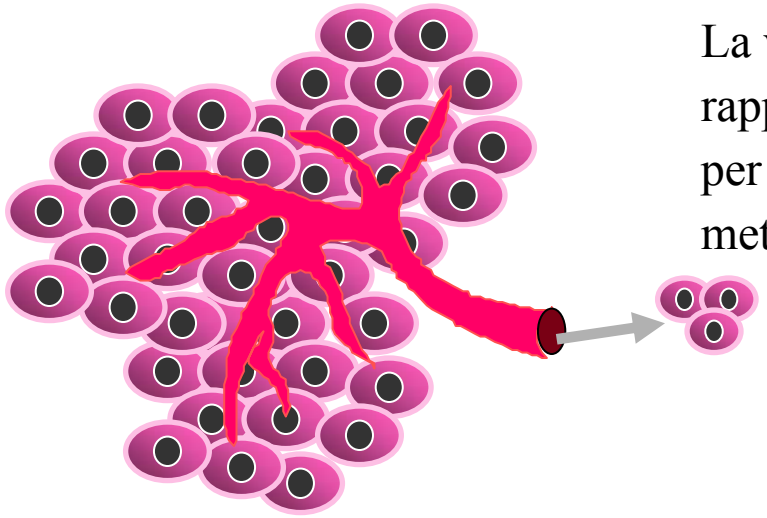
Cellula proliferante

Cellula apoptotica o necrotica



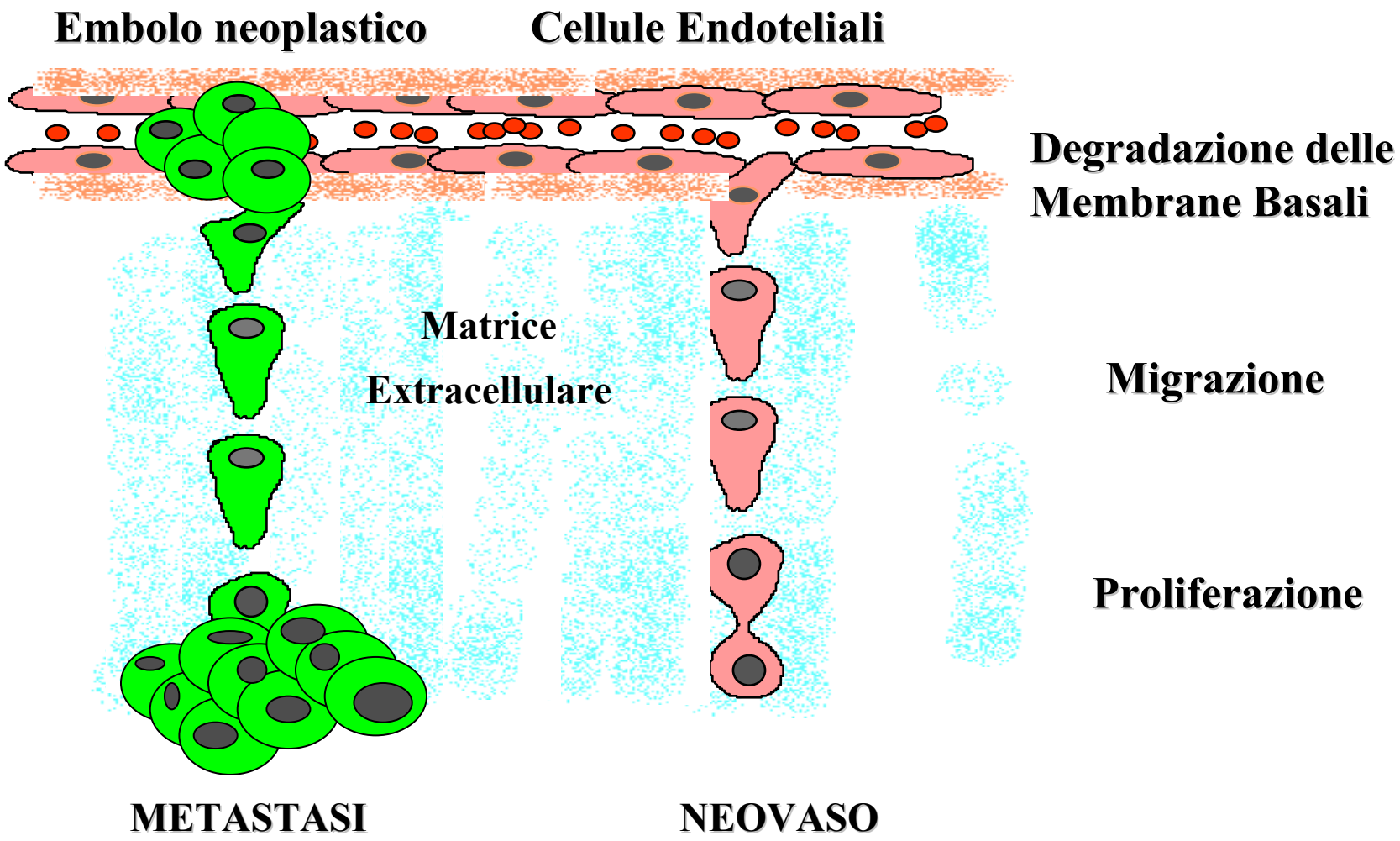
In assenza di un adeguata vascolarizzazione la morte cellulare controbilancia la proliferazione cellulare nel tumore, prevenendone l'espansione oltre pochi mm cubici in diametro.

Il processo di neoangiogenesi indotto dal tumore porta nei vasi il sangue necessario per l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive necessarie per l'espansione della massa neoplastica



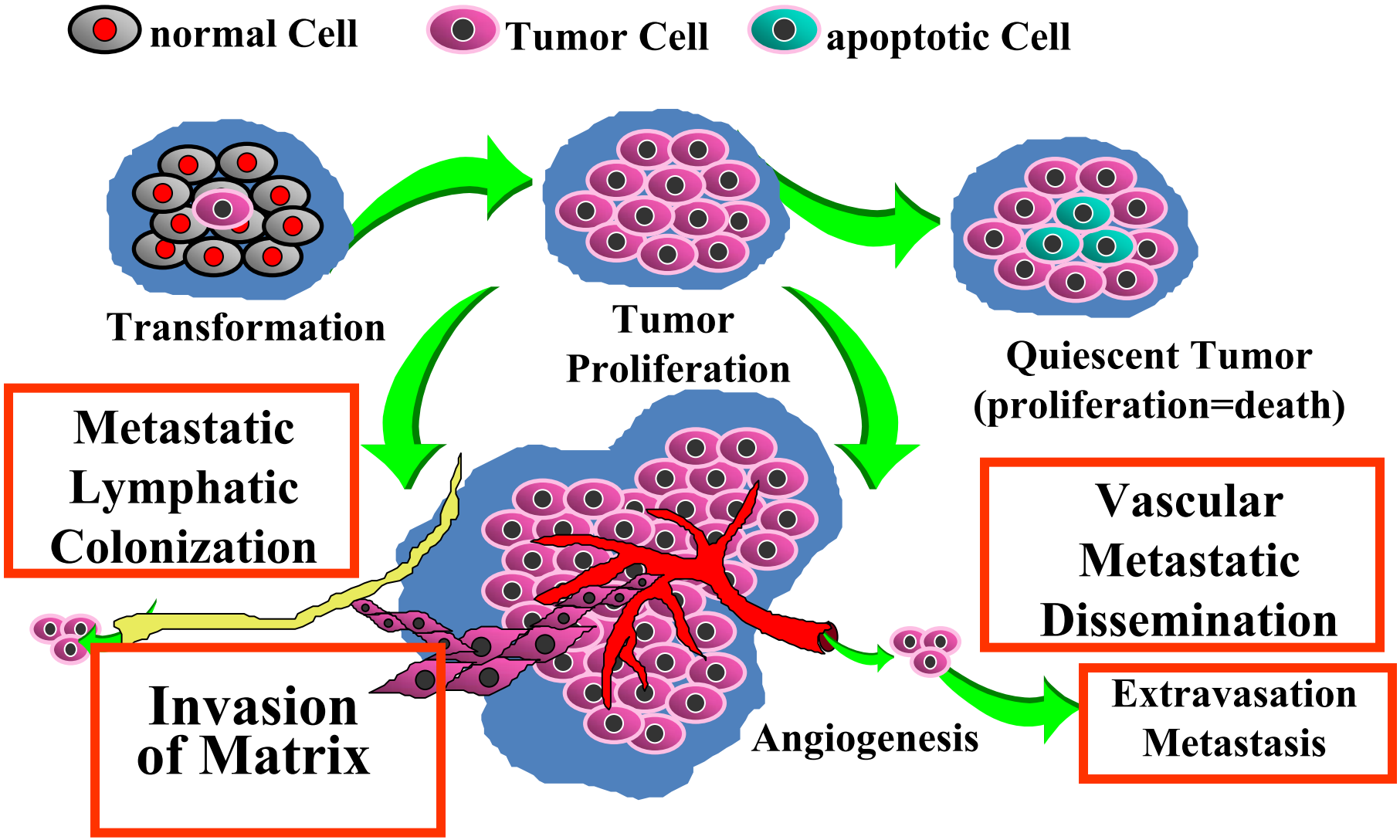
La vascolarizzatione rappresenta anche una via per la diffusione metastatica del tumore

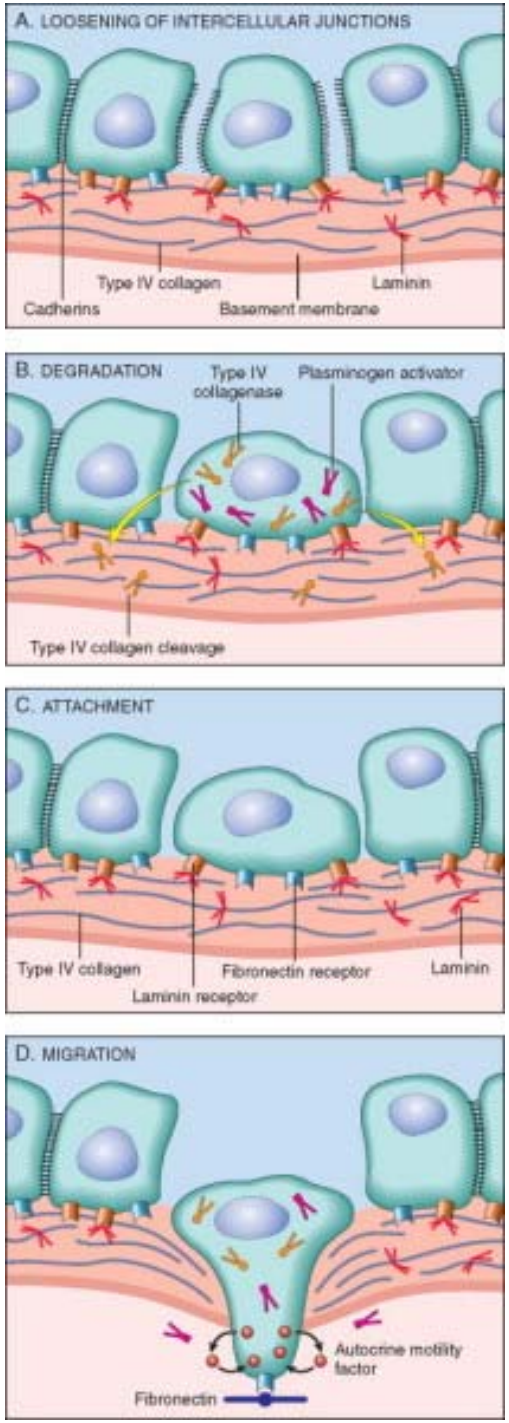
Metastasi e Angiogenesi usano processi comuni



➢Invasione e Metastasi

Invasione e Metastasi





INVASIONE E METASTASI

Le cellule tumorali si staccano l'una dall'altra, producono enzimi proteolitici capaci di degradare le membrana basale, e migrano attraverso lo spazio interstiziale.

Meccanismi patogenetici

➢-alterazioni dei geni che codificano per molecole di adesione (cellula-cellula, e cellula-ECM)

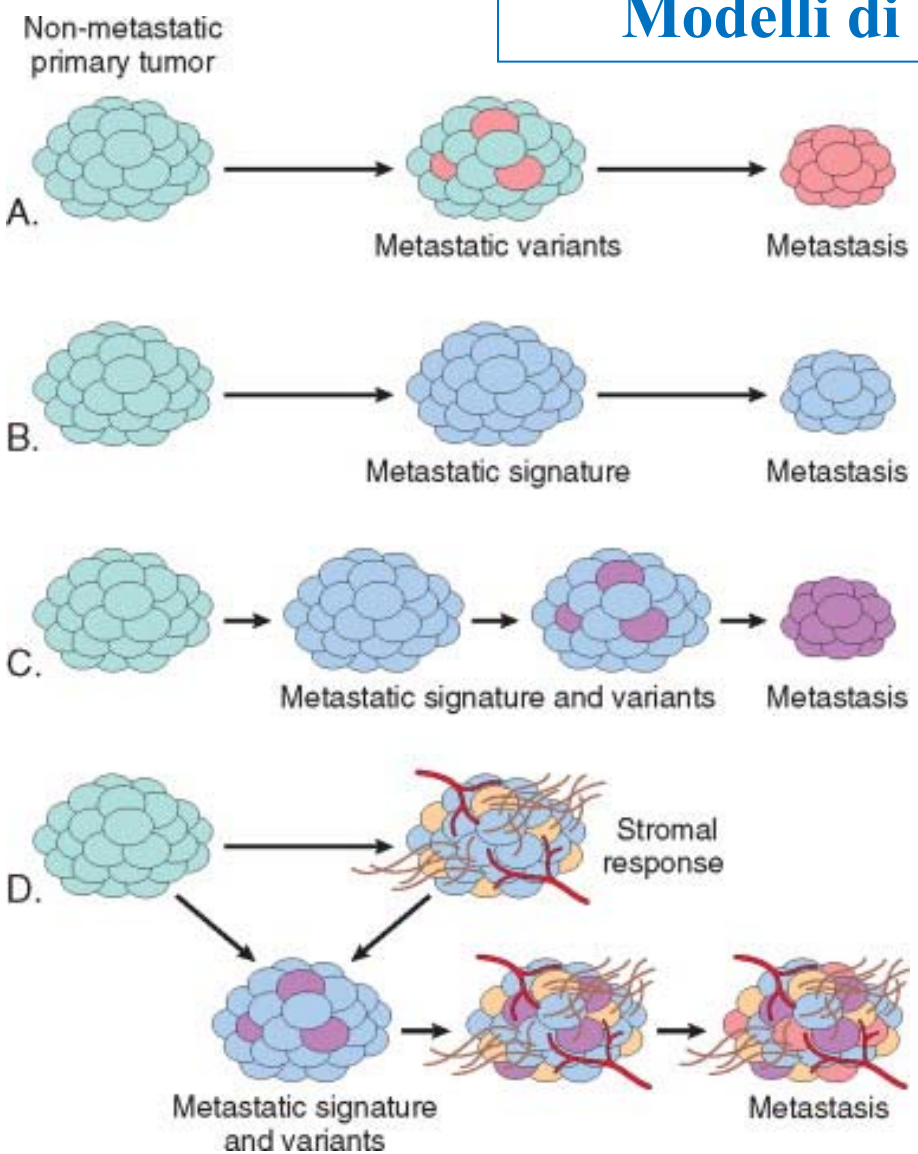
➢-sovra-regolazione di geni che codificano per molecole di adesione operative nell'embriogenesi e nell'infiammazione

➢-attivazione del programma EMT (epithelial-mesenchymal transition): perdita delle giunzioni aderenti e cambiamento della morfologia cellulare (da poligonale/epiteliale a affusolato/fibroblastico; espressione di metalloproteinasi della matrice, aumentata motilità, resistenza all'apoptosi.

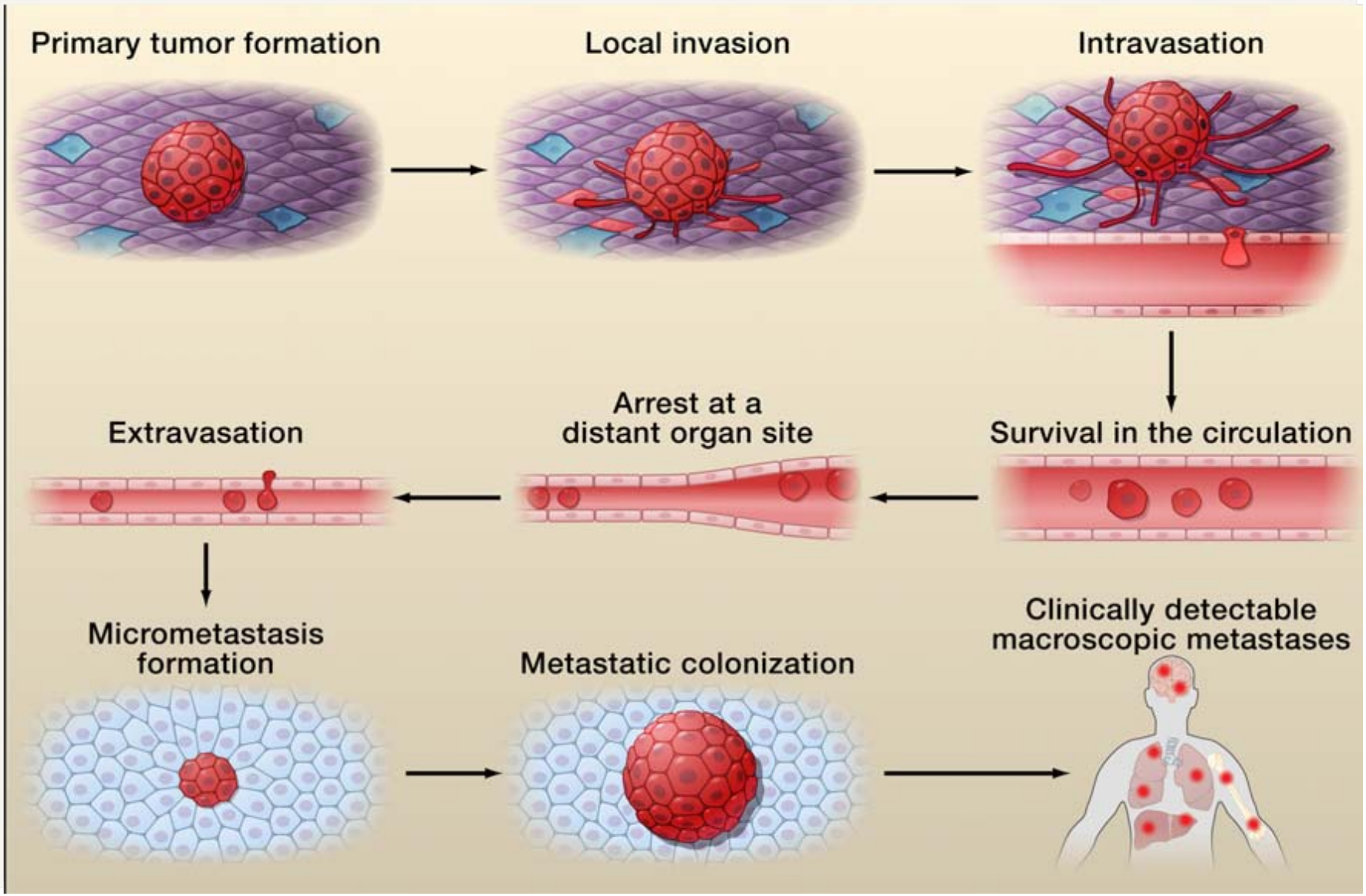
I MECCANISMI DELLA METASTASI

- Per **metastasi** si intende l'autotrapianto spontaneo delle cellule neoplastiche che, **distaccatesi dal tumore primitivo**, raggiungono siti distanti da quello dove ha sede il tumore primario e vi si impiantano dando origine alla formazione di **tumori secondari**.
- Le metastasi identificano in modo inequivocabile un tumore come maligno,
- Con poche eccezioni (gliomi, carcinoma basocellulare della cute, altamente invasivi ma non metastatizzanti) tutti i cancri possono metastatizzare
- In generale, più il tumore è aggressivo, cresce rapidamente e presenta elevate dimensioni, più è probabile che metastatizzi o che abbia già metastatizzato
- Esistono numerose eccezioni. Talvolta tumori piccoli, ben differenziati e a lenta crescita danno metastasi diffuse, mentre tumori che crescono rapidamente possono rimanere localizzati per anni
- Inoltre, la capacità di metastatizzare non è sempre correlata alla capacità di invadere localmente.

Modelli di metastatizzazione

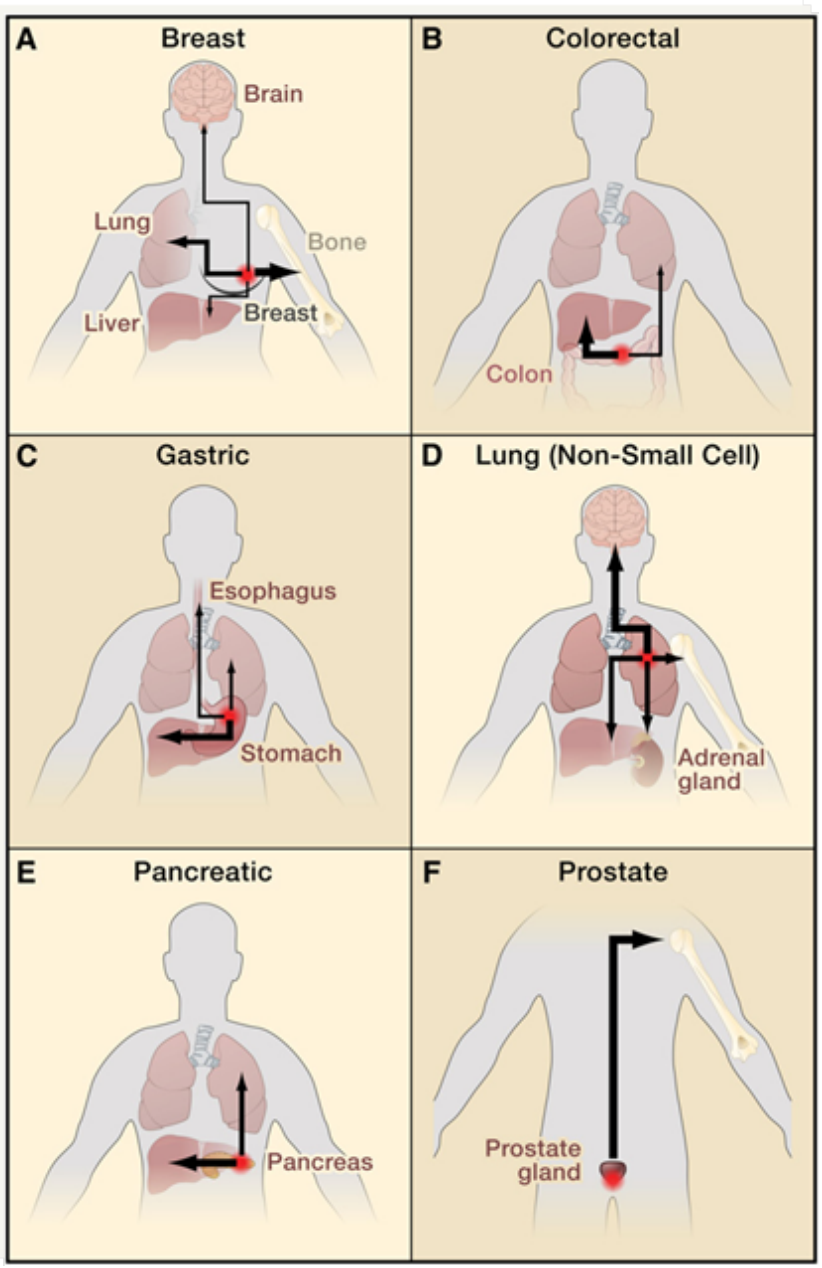


- A| metastasi causata da rari cloni varianti che si sviluppano nel tumore primario.
- B| metastasi causata dalla maggior parte delle cellule del tumore primario caratterizzate da una "*metastatic gene signature*".
- C| combinazione di A e B (cloni varianti in un tumore con *metastatic gene signature*).
- D| la formazione di metastasi è influenzata dallo stroma, che regola l'angiogenesi, l'invasione, la resistenza alla risposta immunitaria, e quindi permette alle cellule tumorali di diventare metastatiche.



Scott Valastyan et al. Cell 147, October 14, 2011

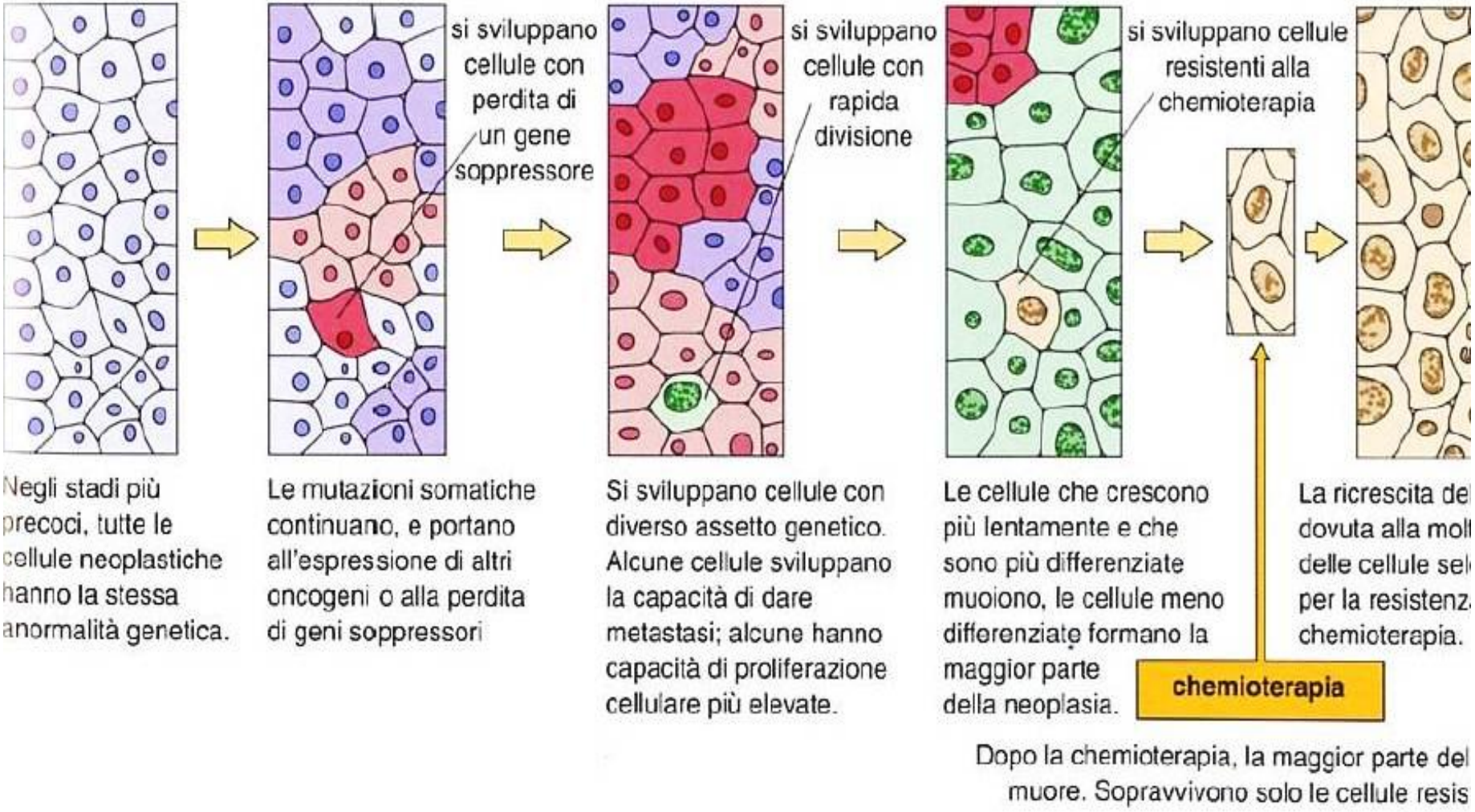
IL PROCESSO DI FORMAZIONE DELLE METASTASI



1889 Stephen Paget -L'ipotesi "Seed and Soil" (Il seme e il terreno):
Le metastasi si sviluppano solo se il seme e il terreno sono compatibili!

Sede del tumore primario	Sede di impianto delle metastasi
Mammella e prostata	ossa
Polmone	Ogni distretto, encefalo compreso
Colon-retto	Fegato-polmone
Testicolo	Polmone, fegato
Ovaio	Cavità addominale, peritoneo e diaframma

Acquisizione di chemioresistenze per selezione clonale



➢Le cause dei tumori

Agenti cancerogeni e loro interazioni cellulari

Origini delle mutazioni

- **Spontanee** – avvengono naturalmente (*e.g.* errori nella replicazione del DNA, lesioni spontanee)

- **Indotte** – create da agenti mutageni

- Le mutazioni avverranno con una frequenza molto piu' elevata se sono indotte da mutageni.

Mutageni

I Mutageni possono causare mutazioni per sostituzione di base, alterazione di base o danno alla base

- **Analoghi delle basi** (e.g. 5-BU) – si puo' appaiare con diverse basi a seconda dello stato chimico

- **Agenti alchilanti** (e.g. EMS, NG) – aggiungono gruppi alchilici alle basi causando misappaiamenti

- **Agenti intercalanti** (e.g. proflavina, arancio acridina) – si inseriscono nella doppia elica DNA causando inserzioni o delezioni

- **Agenti che inducono danno** (e.g. UV, aflatossina B_1) – bloccano la replicazione interferendo con l'appaiamento delle basi

Mutazioni

1. Sostituzioni di Base

Transizioni

(purina-purina or pirimidina-pirimidina)

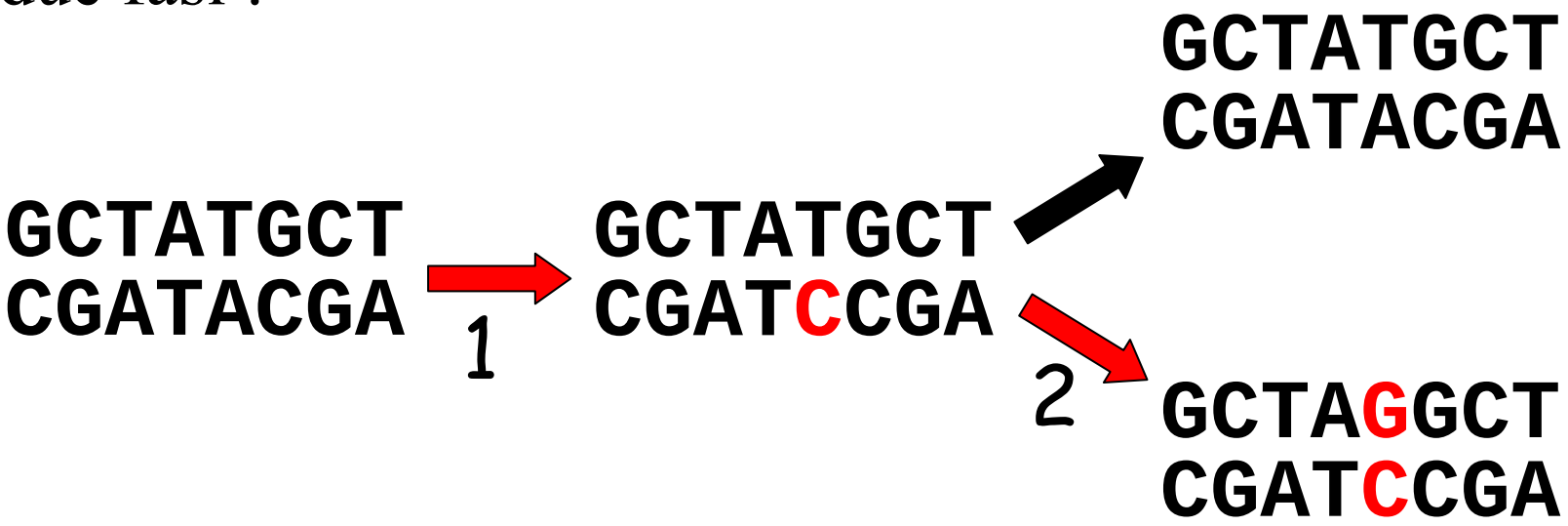
Transversioni

(pirimidina-purina or purina-pirimidina)

2. Inserzioni
3. Delezioni

Mutazioni a livello molecolare

Le mutazioni (spontanee o/e indotte) sono un processo a due fasi :



Primo, un errore viene introdotto in una catena della doppia elica.

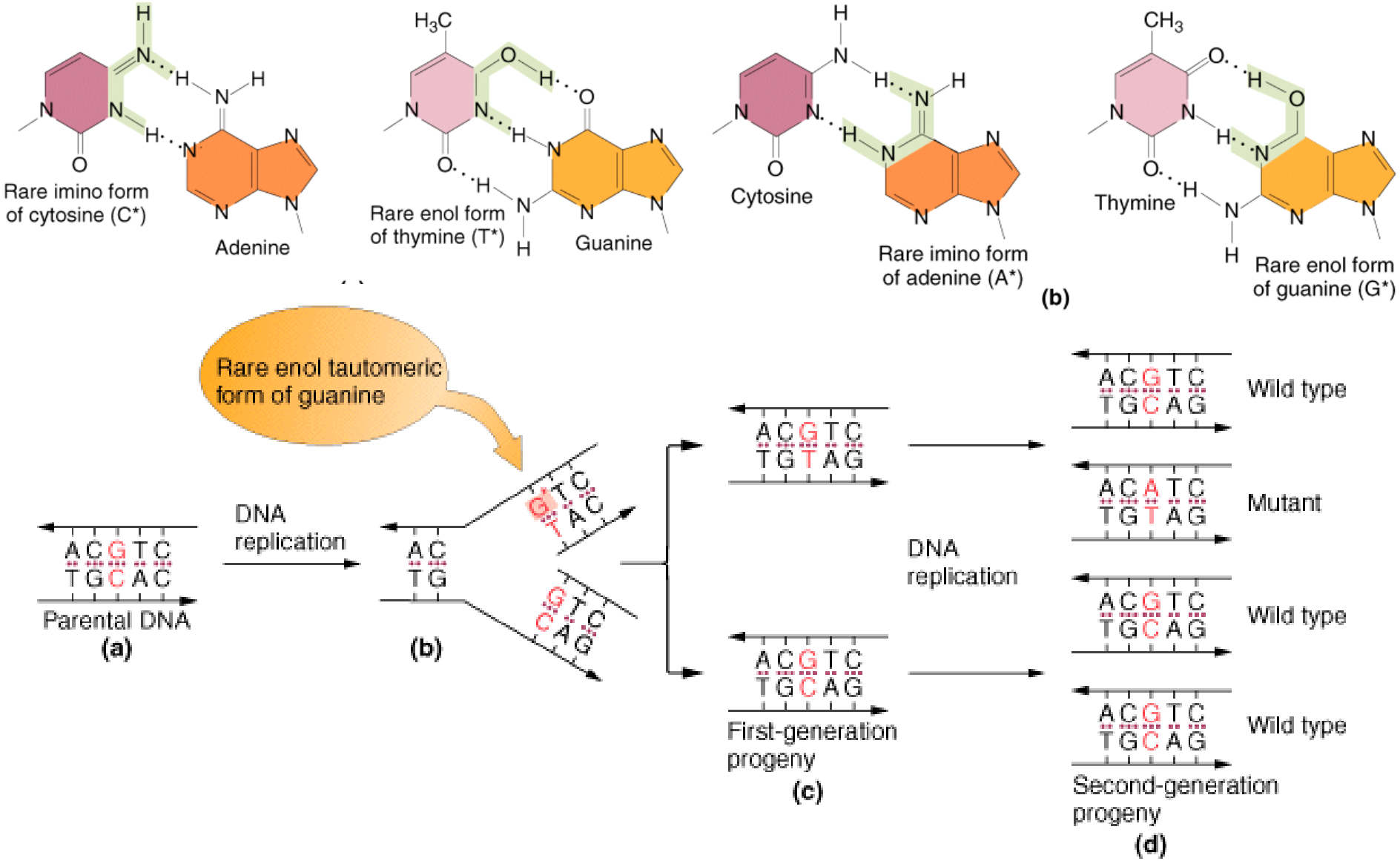
Secondo, l'errore viene consolidato durante la replicazione del DNA.

Sostituzione di base

Un cambio nucleotidico porta alla sostituzione di una coppia di basi appaiate.

C→T porta a C:G →T:A

Shift Tautomerici delle basi causano errori nella replicazione del DNA



Mutagenicita' e carcinogenicita

- I Mutageni sono composti che causano mutazioni nel DNA
- I Carcinogeni sono composti che causano cancro
- Il 90% dei carcinogeni sono anche mutageni

Cancerogenesi chimica

Cenni storici:

- J. Hill (polipi nasali nei consumatori di tabacco da fiuto)

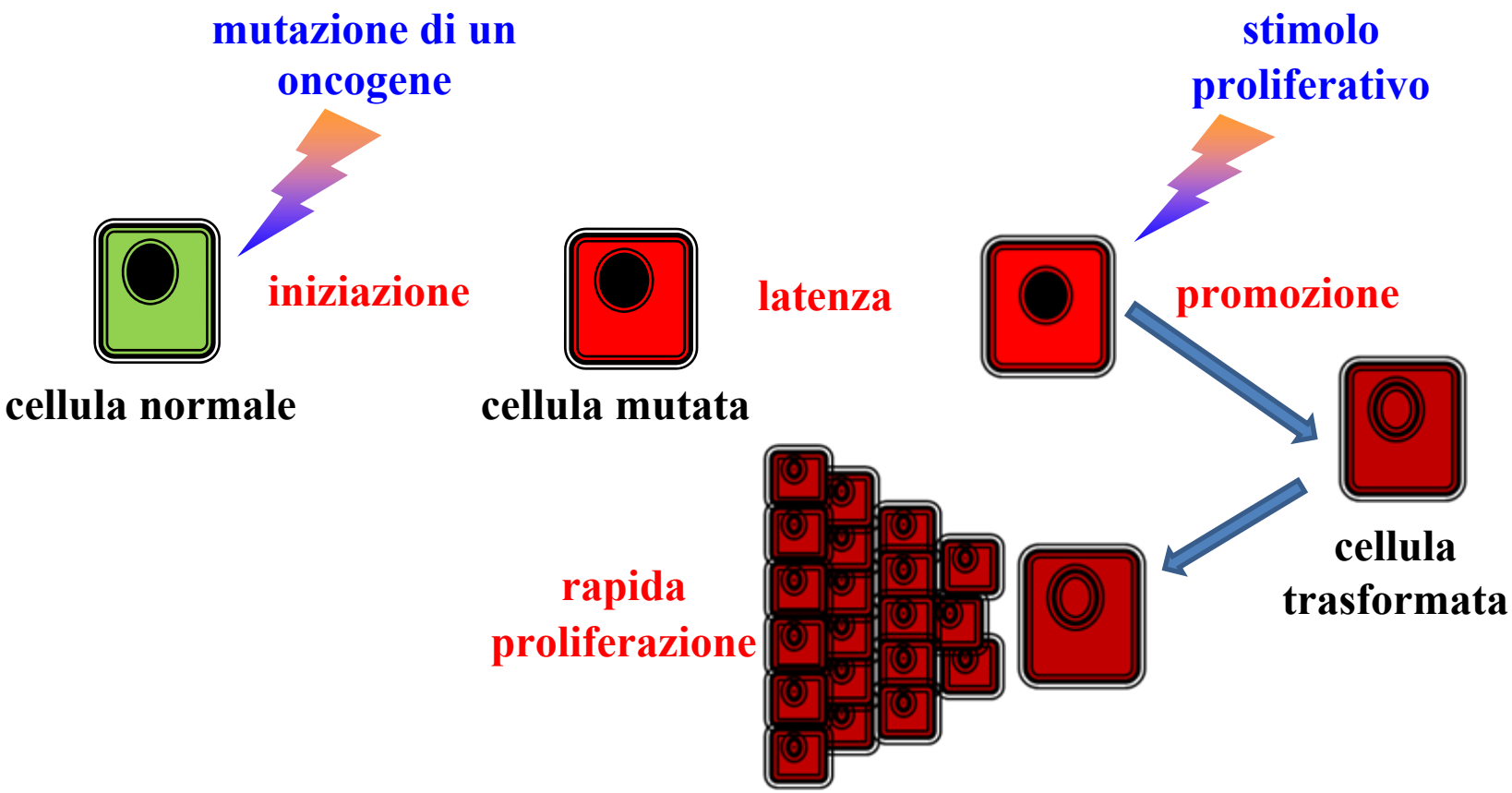
- P. Pott (tumori epiteliali scrotali negli spazzacamini)

- I modelli sperimentali di cancerogenesi chimica hanno dimostrato la natura multifasica del processo di cancerogenesi

CANCEROGENESI CHIMICA

- E' il processo mediante il quale, a partire da una cellula iniziata, ossia mutata da un agente cancerogeno detto **iniziante**, si sviluppa la neoplasia
- Le sostanze responsabili di tale evento, dette **promoventi**, non sono cancerogeni se somministrati separatamente dall'iniziante
- Lo sviluppo della neoplasia è innescato da un'intensa proliferazione cellulare: di fatto, il promovente è una molecola che induce di iperplasia.
- L'azione dei promoventi è, entro certi limiti, reversibile e si manifesta solo sopra una certa dose soglia ed entro intervalli di tempo non troppo distanziati dall'applicazione del mutageno iniziante

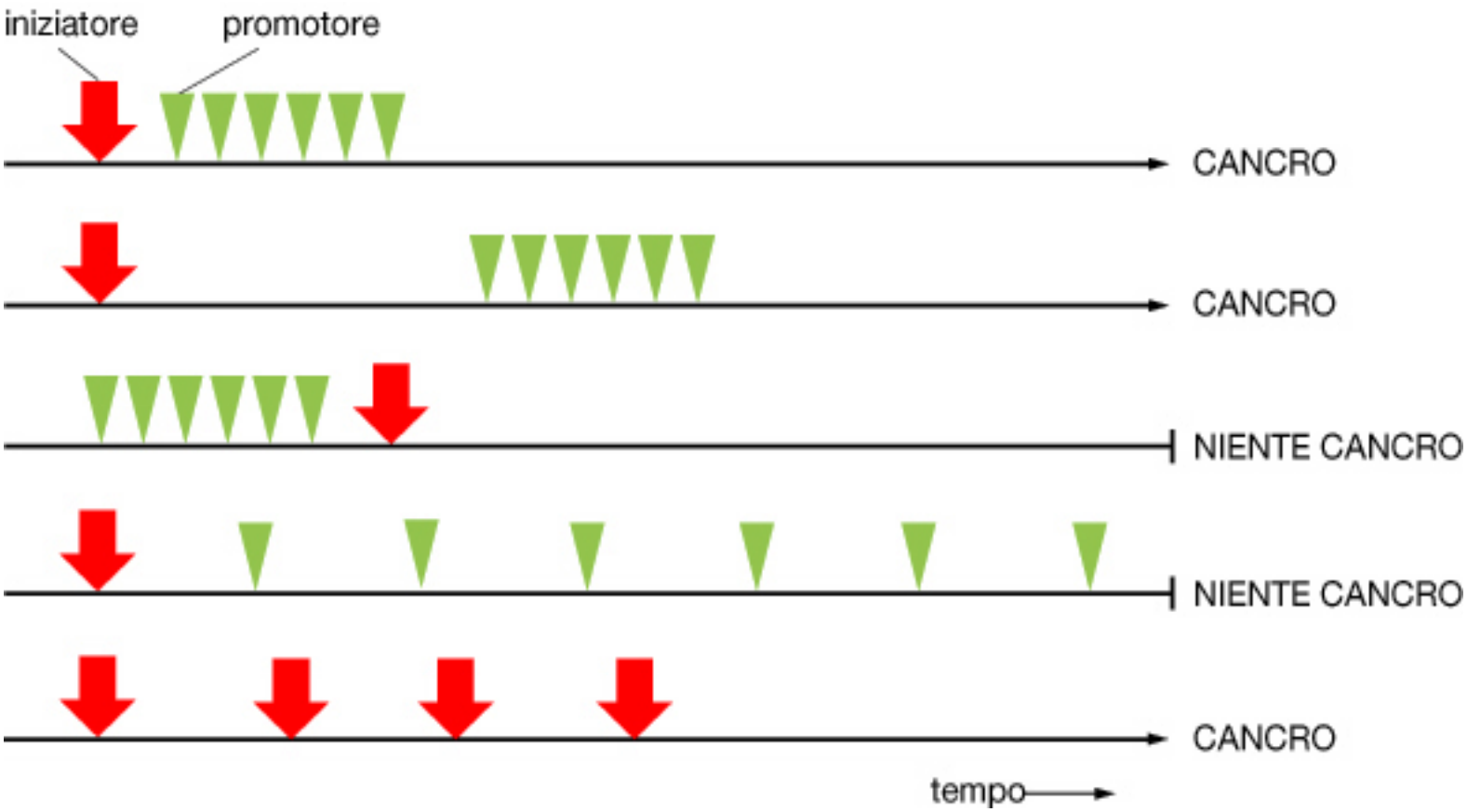
INIZIAZIONE E PROMOZIONE



Le cellule in rapida proliferazione sono più vulnerabili all'azione di mutageni. Ciò è sostanzialmente dovuta al fatto che:

- la cellula proliferante passa più tempo in metafase, quando la cellula è più sensibile ai mutageni.
- la rapida suddivisione del materiale genetico impedisce ai sistemi di riparazione di agire ripristinando il DNA danneggiato

INIZIAZIONE E PROMOZIONE



FATTORI PROMOVENTI

fattori promoventi	sede d'insorgenza
ormoni	
estro-progestinici	mammella
estrogeni	endometrio
ovulazione	ovaio
testosterone	prostata
prolattina	mammella
agenti infettivi	
helicobacter pylori	stomaco
schistosoma japonicus	tratto biliare
schistosoma haematobium	vescica
opisthorchis viverrini	tratto biliare
virus di Epstein-Barr	tessuto linfatico
virus epatite B, C	fegato

FATTORI PROMOVENTI

fattori promoventi	sede d'insorgenza
farmaci	
contraccettivi orali	fegato
phenobarbital	fegato
steroidi anabolizzanti	fegato
analgesici	pelvi renale
agenti chimici	
calce	cavo orale
semi di areca	cavo orale
saccarina	vescica
traumi fisici/meccanici	
asbestosi	mesotelio, polmone
calcoli biliari	cistifellea
onde sonore aperiodiche	nervo acustico

FATTORI PROMOVENTI

fattori promoventi	sede d'insorgenza
altre irritazioni croniche	
Ulcere tropicali	cute
Colite ulcerosa cronica	colon
Abitudini alimentari e varie	
alcoolismo	fegato
dieta iperlipidica/ ipercalorica	aumento dell'incidenza generale
fumo di sigaretta	polmone, bronchi esofago, vescica

Principali cancerogeni chimici

Cancerogeni diretti

- **agenti alchilanti** : β-propriolattone, dimetilsolfato, diepossi-butano, ciclofosfamide e altri farmaci antitumorali
- **agenti acetilanti** : 1-acetilimidazolo

Si tratta di cancerogeni "deboli", particolarmente importante il gruppo dei farmaci antitumorali

Cancerogeni indiretti

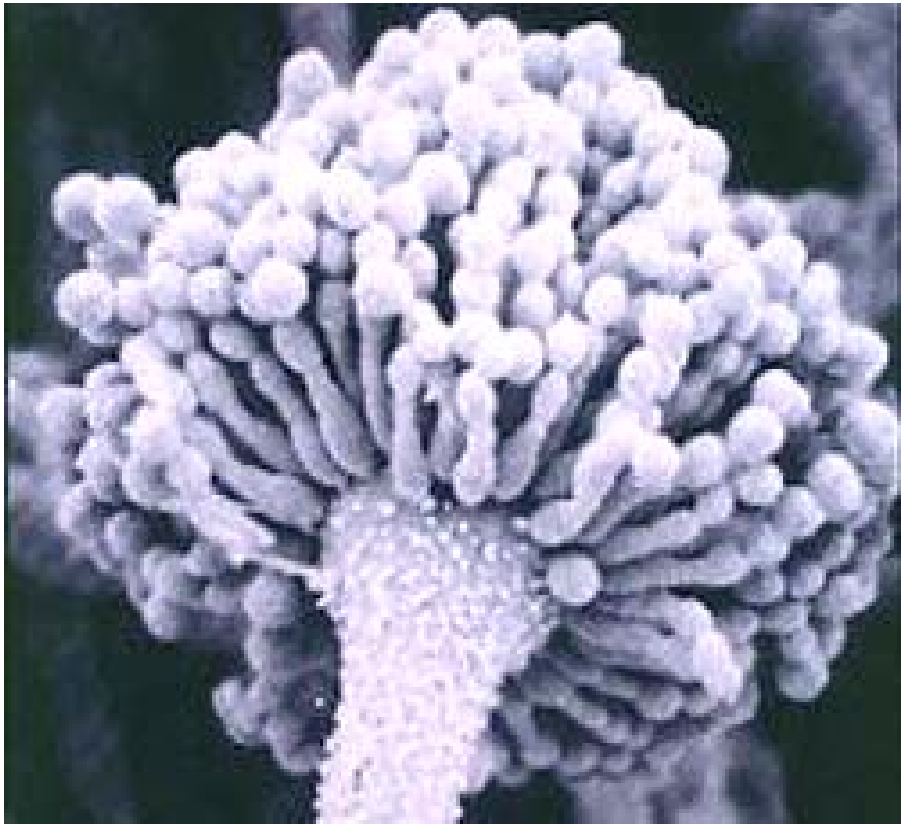
(procancerogeni, richiedono attivazione metabolica)

- **idrocarburi aromatici policiclici ed eterociclici:** benzoantracene, benzopirene, dibenzoantracene, metilcolantrene, dimetil-benzantracene

- **ammine aromatiche, ammidi, azo-composti:** naftilammina, benzidina, acetil-amminofloruene, dimetil amminoazobenzene

Cancerogeni naturali

- **Aflatossina B1** (Aspergillus flavus), ca. epatocellulare epidemico in Africa ed estremo Oriente), in associazione sinergica con HBV.



Aspergillus Flavus

Altri agenti

Asbesto

Cloruro di vinile

Cromo, nickel, e altri metalli pesanti

Insetticidi : aldrina, dieldrina, clordano

Gli agenti fisici: Radiazioni UV

L'esposizione ai raggi UV aumenta l'incidenza del ca
a cellule squamose, del basalioma, e del melanoma
Il grado di rischio dipende da:

- **Lunghezza d'onda**:

UVA (320-400 nm),
UVB (280-320 nm),
UVC (200-280 nm), e **intensità** di esposizione

- Quantità di **melanina cutanea** (caratteristiche razziali)
- **Latitudine** (maggiori rischi all'equatore)

Gli agenti fisici: radiazioni ionizzanti

Le radiazioni elettromagnetiche (x e γ) e corpuscolari (α, β, protoni e neutroni) sono cancerogene

Principali evidenze epidemiologiche:

- tumori cutanei nel personale addetto ai raggi X non adeguatamente protetto
- tumori polmonari di operai in miniere di materiale radioattivo
- leucemie e tumori solidi nei sopravvissuti ai bombardamenti di Hiroshima e Nagasaki
- tumori della tiroide e leucemie in pazienti esposti a irradiazione terapeutica per spondilite anchilosante
- Fallout accidentale di esplosioni atomiche sperimentali

Principali tumori da radiazioni ionizzanti

In ordine decrescente:

- Leucemie (eccetto LLC)
- Cancro della tiroide (soprattutto in età giovanile)
- Cancro della mammella, del polmone e tumori delle gh salivari
- Tumori della pelle, delle ossa, e del tratto gastro-intestinale

I virus oncogeni, virus a DNA

Virus a DNA implicati nella cancerogenesi Umana

- **Papillomavirus** (ca cervice uterina)
- **Virus di Epstein-Barr** (linfomi)
- **HBV** (virus epatite B; tumori epatici)
- **KSHV** (virus erpetico del sarcoma di Kaposi)

Caratteristiche patogenetiche generali dei virus oncogeni a DNA

- Il genoma virale si associa stabilmente con il genoma dell'ospite; durante l'integrazione, geni virali per il completamento del ciclo replicativo vengono interrotti.

- I geni virali trascritti nelle fasi iniziali dell'infezione (early genes) sono importanti per la trasformazione tumorale

I virus oncogeni, virus a RNA

- Solo un retrovirus è implicato nella cancerogenesi umana: HTLV-1 (Human T cell leukemia virus), patologia endemica in Giappone.
- Come HIV, HTLV-1 ha tropismo per le cellule T CD4+ e l'infezione si trasmette prevalentemente per via sessuale, oltre che con l'allattamento e con sangue.
- Dopo una latenza di 20-30 anni, nell'1% degli infetti si sviluppa la leucemia.
- La patogenesi è attribuita al gene virale **tax** che attiva la trascrizione di geni dell'ospite (vari GFs e GM-CFS, stimolando la proliferazione (in modo autocrino e paracrino).

➢ Caratteristiche cliniche dei tumori

Caratteristiche cliniche dei tumori

- Con poche eccezioni (p.e. lipomi), tutte le masse richiedono una valutazione chirurgica e anatomo-patologica.

Conseguenze cliniche dei tumori

- **localizzazione** (compressione organi adiacenti)
- possono avere **attività funzionale** (per esempio sintesi di ormoni sostanze ormono-simili)
- **sanguinamento**
- possono determinare **infezioni secondarie** (più frequenti quando vi siano ulcerazioni su superfici naturali adiacenti).
- possono dare sintomi da **rottura o infarto.**

In tutte le circostanze sopra menzionate, ci può essere **sintomatologia dolorosa** più o meno accentuata.

La cachessia dei tumori maligni

- Cachessia tumorale: calo ponderale progressivo (massa muscolare e grasso corporeo), con astenia, anoressia e anemia.
- Non dovuta alle richieste nutrizionali del tumore o all'anoressia del paziente, ma piuttosto all'azione di fattori solubili (citochine) prodotti sia dalle cellule tumorali che dalle cellule dell'ospite.
- Nell'animale da esperimento, cachessia e anoressia possono essere provocate somministranto **TNF-α**, in possibile sinergia con **IL-1** e **IFN-γ**.

Classificazione clinica

Grading e stadiazione dei tumori

- il **grading** è la descrizione semi-quantitativa della differenziazione di un tumore maligno;

- la **stadiazione** è l'entità della diffusione della malattia in un paziente.

Grading

- Basato sul grado di differenziazione delle cellule tumorali e sul numero di mitosi. La classificazione è **grado I-IV** (in correlazione alla crescente anaplasia).

- Ogni forma di neoplasia ha parametri di grading individuali, ma in generale si giudica quanto una cellula tumorale assomigli (o non assomigli) alla controparte normale.

Stadiazione

UICC-Unione internazionale contro il cancro e **AJCC**-American Joint committee on cancer-**1987**

I criteri si basano sulle **dimensioni della lesione primaria**, sulla **diffusione verso i linfonod regionali**, sulla presenza o meno di **metastasi ematogene**.

TNM

T = dimensioni del tumore primario; T0 = in situ; T1-T4;

N = linfonodi; N0 = nessun linfonodo; N1-N3 coinvolgimento crescente di linfonodi e stazioni linfonodali

M = metastasi; M0 = no metastasi ematogene; M1 (a volte M2) metastasi ematogene (con eventuali giudizi sul numero).

La stadiazione è al momento la migliore e più affidabile premessa per la scelta della miglior forma di terapia.

La prevenzione dei tumori

- **Prevenzione primaria**: individuazione (e allontanamento) delle cause (indagini epidemiologiche e di laboratorio)

- **Prevenzione secondaria**: diagnosi precoce, ovvero diagnosi in assenza di sintomi (o con sintomi e segni generici), (indagini epidemiologiche, diagnosi di laboratorio, e medico-chirurgiche)

- **Prevenzione terziaria**: prevenzione e/o individuazione tempestiva della ripresa di malattia (diagnosi di laboratorio, e medico-chirurgiche)

Prevenzione primaria

- Indagini epidemiologiche (registri di morbilità e mortalità per tumori)

- Indagini di laboratorio: test di cancerogenesi e test di mutagenesi

Prevenzione secondaria

Tumori per i quali è possibile la diagnosi precoce:

- Tumori apparato genitale femminile (mammella, cervice uterina)

- Tumori gastro-intestinali (anemia ipocromica da emorragia cronica)

- Tumori cutanei

«La sola speranza di arrivare un giorno a controllare i tumori risiede nella maggiore comprensione delle cause e della patogenesi di questa malattia»