

Università degli Studi di Messina

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Mediche e Chirurgiche

(Direttore: Prof. G. Squadrito)

S.S.D. Ginecologia e Ostetricia

(Tutor: Prof.ssa R. Granese)



DALL'IMMUNOTOLLERANZA DELL'INTERFACCIA
MATERNO-FETALE ALL'IMMUNE-ESCAPE NEL CARCINOMA
DELL'ENDOMETRIO: RUOLO DI LOX-1 E NLRP3

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Roberta Granese

Tesi di Dottorato di:

Dott. Benito Chiofalo

Anno Accademico 2019 / 2020

INDICE

INTRODUZIONE	1
MATERIALI E METODI	9
RISULTATI	14
DISCUSSIONE	18
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUZIONE

Il carcinoma dell'endometrio è la neoplasia ginecologica più diffusa nei Paesi industrializzati [1]. L'incidenza più alta si ha nelle donne con età superiore ai 40 anni e nella post-menopausa [2].

Il sintomo principale è il sanguinamento vaginale anomalo [1], nel dirimere il dubbio diagnostico un ruolo importante è rappresentato dall'ecografia transvaginale, mentre l'isteroscopia è l'indagine di secondo livello, utile a ottenere un prelievo biotico mirato per la definitiva diagnosi istologica [3].

In caso di neoplasia endometriale il riscontro ecografico più tipico è la presenza di un ispessimento endometriale o di una neoformazione endometriale riccamente vascolarizzati.

L'immagine isteroscopica è molto variabile, dipende dall'estensione di malattia a livello endometriale e dal tipo istologico. Solitamente l'endometrio appare sanguinante, friabile, papillare/cerebroide, con vascolarizzazione atipica.

Istologicamente questa neoplasia origina dalle ghiandole endometriali di derivazione mulleriana. Classicamente distinguiamo due varianti di carcinoma endometriale, il tipo I endometrioide, ormono-dipendente e il tipo II non endometrioide, non estrogeno dipendente [4].

Il tipo I è quello più diffuso, risente di fattori costituzionali, legati a tutte quelle situazioni che comportano un iperestrogenismo relativo (nulliparità, obesità, sindrome dell'ovaio policistico, terapie ormonali) e a patologie cardiovascolari

e metaboliche, come l'ipertensione arteriosa e il diabete mellito, mentre il tipo II è rappresentato dal carcinoma sieroso e dal carcinoma a cellule chiare.

Esiste anche una predisposizione eredo-familiare legata alla sindrome di Lynch, la cui presenza deve essere sempre indagata, in caso di insorgenza di carcinoma endometriale in giovane età e in pazienti con storia personale o familiare di neoplasie del colon/retto [5].

La stadiazione del carcinoma endometriale è chirurgica e prevede una classificazione codificata dalla Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia (FIGO), esiste anche una più recente classificazione molecolare codificata dalla Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA). Una pre-stadiazione con esami strumentali è utile per una corretta programmazione terapeutica e prevede lo studio dell'infiltrazione miometriale e dello stroma cervicale attraverso la risonanza magnetica nucleare con mezzo di contrasto o l'ecografia trans-vaginale di secondo livello. Inoltre, nelle pazienti con sospetta malattia metastatica, con istotipi rari o adenocarcinoma endometriode G3 è utile uno staging con tomografia computerizzata addome e torace con mezzo di contrasto o PET/TC total body per escludere eventuali ripetizioni di malattia a distanza.

La prognosi del carcinoma dell'endometrio è favorevole nell'istotipo classico nei primi stadi di malattia e il trattamento è prettamente chirurgico, seguito da eventuali terapie adiuvanti, che vengono indicate sulla base di alcuni fattori prognostici [6-7]. Lo stadio FIGO, il grado di differenziazione, la profondità di

invasione miometriale, l'interessamento cervicale, l'infiltrazione degli spazi linfo-vascolari e lo status linfonodale sono i principali fattori prognostici classicamente utilizzati, a questi si stanno affiancando negli ultimi anni alcuni marcatori molecolari codificati dalla TCGA, come PTEN, KRAS, CTNNB1, l'instabilità dei microsatelliti (MSI), TP53, Ki-67, p16, CDH1 ed HER2.

Negli stadi avanzati di malattia e negli istotipi rari, la prognosi rimane infausta. Lo screening delle pazienti a rischio di sviluppare un carcinoma dell'endometrio non è tutt'oggi possibile, poiché non esistono biomarkers sensibili da poter utilizzare a questo scopo. L'ecografia e l'isteroscopia restano il gold standard nelle pazienti con patologia endometriale predisponente, come i diversi quadri di iperplasia e di poliposi endometriale.

Da diversi anni è ormai noto, che la composizione ambientale dell'interfaccia materno-fetale è in parallelo con il micro-ambiente tumorale (TME) identificato in diverse neoplasie maligne [8-9]. Un'adeguata risposta infiammatoria iniziale è indispensabile nelle fasi iniziali dell'impianto embrionario, essa stimola infatti le cellule deciduali stromali (gate-keepers) per il successivo passaggio a un micro-ambiente anti-infiammatorio, necessario per il non-rigetto del feto, stato che si mantiene attivo fino al parto.

Durante il travaglio si ha un nuovo viraggio, verso un ambiente pro-infiammatorio, necessario all'attivazione dei vari meccanismi biomolecolari del parto, che ripristinano una fisiologica protezione contro gli agenti esterni nelle fasi successive del post-partum e del puerperio.

Allo stesso modo, nelle fasi iniziali della cancerogenesi, il sistema immunitario riconosce le cellule tumorali come “non-self”, inducendo un proprio ambiente pro-infiammatorio. In una seconda fase, le cellule tumorali sono in grado di sfuggire al sistema immunitario, cambiando il microambiente verso una risposta anti-infiammatoria. L’ultima fase è assente nella cancerogenesi, essendo il processo di “immune escape” incontrollato nel cancro, rispetto alla gravidanza, considerato che non torna più ad una risposta pro-infiammatoria [10].

C’è comunque da precisare che, non in tutte le gravidanze questi meccanismi sono così ben codificati. In talune situazioni patologiche, come in alcuni casi di poliabortività e nella preeclampsia, la tolleranza immunitaria può essere ridotta [15].

L’induzione di un ambiente immunitario soppressivo/anergico, tollerante/permisivo in condizioni fisiologiche e patologiche è raggiunta attraverso il coordinamento e l’interazione di diverse cellule del sistema immunitario, tra cui le Natural Killer (NK), le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs), i macrofagi e i linfociti T [10].

A tale riguardo, una conoscenza dettagliata delle interazioni tra fattori immunologici positivi e negativi e le relative tempistiche nello sviluppo e nella progressione del carcinoma dell’endometrio rimangono in gran parte sconosciuti.

Sulla base dell’ipotesi che la struttura degli adattamenti immunitari, sincronizzati con precisione all’interfaccia materno-fetale e interrotti nelle

complicanze della gravidanza, potesse rivelare uno specifico “orologio immunitario” adattabile ai tumori, il nostro scopo è quello di: 1) decifrare i meccanismi di immunoelaborazione per riuscire a predire le possibili recidive di carcinoma dell’endometrio; 2) identificare le vie molecolari che si accendono o si spengono nella progressione dalle lesioni pre-neoplastiche fino alla neoplasia conclamata, al fine di identificare potenziali bersagli/checkpoint immunoterapici, per interferire con il processo di attivazione dell’immunità di fuga (rimodulare l’immune-escape) o per riattivare/ri-educare la risposta immunitaria.

A tal fine, il carcinoma dell’endometrio di tipo I rappresenta un modello ideale di progressione oncologica, poiché mantiene sempre una somiglianza istologica con il tessuto endometriale sano dal quale origina e solitamente si passa da uno stadio di iperplasia endometriale, prima semplice, poi complessa, infine atipica, per arrivare al carcinoma conclamato G1, G2 o G3 [7].

I meccanismi di evasione immunitaria alla base di questa progressione, attraverso specifiche modificazioni morfologiche dall’endometrio fisiologico al carcinoma, attraverso i diversi istotipi di iperplasia, se individuati, possono costituire un target personalizzato dell’immunoterapia, riattivando il processo di risposta pro-infiammatoria, quindi inibendo la trasformazione e la progressione carcinomatosa.

In dettaglio, la diversa espressione del recettore Lectin-type Oxidized LDL type 1 (LOX-1) e del NOD-Like Receptor Protein 3 (NLRP3/NALP3), è stata

studiata in diversi tipi istologici di endometrio, dal fisiologico al cancro, per identificare firme immunitarie condivise tra l'interfaccia materno-fetale e le diverse fasi della progressione verso il carcinoma, per poter indagare il loro ruolo funzionale nel processo di immune escape nel tumore e/o nella risposta pro-infiammatoria.

La scelta di questi marcatori nasce dall'intento di poter modulare a monte alcuni dei processi di fuga immunitaria, che a loro volta generano diverse cascate biomolecolari, sinergicamente coinvolte nell'evoluzione verso il cancro della malattia precancerosa.

Inoltre, la scelta di questi biomarcatori è proiettata all'individuazione di target per future applicazioni cliniche.

LOX-1 e NALP3, e più in generale gli inflammasomi della famiglia NALP, sono coinvolti sia nell'interruzione della tolleranza immunitaria materno-fetale nelle complicazioni della gravidanza, come nella preeclampsia e nell'abortività ricorrente, che nei diversi tipi di progressione oncologica, quindi nella prognosi della malattia oncologica [11-18].

LOX-1 è stato inizialmente identificato come il recettore principale per le LDL ossidate (OxLDL - lipoproteine a bassa densità) nelle cellule endoteliali, in un secondo momento è stata osservata una sua espressione inducibile nei macrofagi e nelle cellule muscolari lisce [19]. LOX-1 è una proteina di membrana tipo II con una tipica struttura lectinica di tipo C. Può essere scisso da una proteasi sconosciuta nella regione extracellulare per essere rilasciato in una forma

solubile. Il dominio lectinico extracellulare subisce un glicosilazione post-traduzione, che gli permette di riconoscere il ligando di LOX-1. I residui dell'estremità C-terminale e altri residui caricati positivamente, sono essenziali per il legame con le OxLDL. L'attivazione di LOX-1 da parte delle OxLDL provoca cambiamenti endoteliali, caratterizzati dall'attivazione del fattore nucleare-KappaB, attraverso un aumento delle specie reattive dell'ossigeno e la successiva induzione di molecole di adesione e infine apoptosi endoteliale.

In vitro, l'espressione di LOX-1 è indotta da molte citochine pro-infiammatorie, dallo stress ossidativo, da stimoli emodinamici e dalle OxLDL. In vivo, la sua espressione è stimolata in contesti pro-aterogenici (ipertensione, iperlipidemia e diabete) e, in effetti, si accumula nelle placche ateromasiche e nelle lesioni glomerulari. LOX-1 interagisce con i più classici ligandi implicati nella patogenesi dell'aterosclerosi, infatti può riconoscere cellule apoptotiche, piastrine attivate, batteri, il che implica funzioni fisiologiche molto versatili [19].

Il dominio extra-cellulare di LOX-1 sembra avere un ruolo importantissimo nella risposta adattativa innata ed è stato correlato alla soppressione immunitaria nel cancro e alla progressione della malattia oncologica [11].

Gli inflammasomi sono complessi multiproteici citoplasmatici, che mediano la maturazione delle citochine pro-infiammatorie, per tale motivo hanno un importante ruolo nella regolazione dell'immunità innata. L'assemblaggio dell'inflammosoma dipende da una famiglia di recettori di tipo NOD (NLR).

NLRP3 è il gene più studiato e codifica per la proteina NALP3, attivata in risposta a numerosi segnali intracellulari, che pare giochi un ruolo importante in malattie infiammatorie, autoimmuni, metaboliche, cardiovascolari, neurodegenerative e anche psichiatriche [20].

Nei tumori, l'inflammasoma può contribuire alla formazione e al mantenimento del microambiente tumorale (nicchia ecologica infiammatoria che circonda le cellule neoplastiche).

L'aumentata espressione dell'inflammasoma NALP3 nei macrofagi tumore associati (*TAMs*) del microambiente tumorale, si correla con l'aggressività della neoplasia e le metastasi [21].

La disregolazione dell'inflammasoma NALP3 è coinvolta nella patogenesi e nella progressione del cancro attraverso dei micro-RNA selezionati, come miR-200, che hanno come bersaglio specifico l'mRNA dei geni correlati all'inflammasoma stesso [18].

MATERIALI E METODI

Il presente è uno studio pilota, retrospettivo, condotto su un campione di pazienti trattate chirurgicamente per patologie ginecologiche presso l'Unità Operativa Complessa di Ginecologia Oncologica dell'IRCCS Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" di Roma.

Obiettivi dello studio

Obiettivo principale: indagare l'espressione di LOX-1 e NALP3 nelle diverse fasi della cancerogenesi endometriale.

Obiettivi secondari: esplorare i percorsi immunologici condivisi tra il processo fisiologico di impianto embrionale e il processo di carcinogenesi e identificare potenziali bersagli immunoterapici nel carcinoma dell'endometrio.

Popolazione oggetto di studio

Campioni di endometrio fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), conservati presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'IRCCS Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" di Roma e ottenuti da interventi chirurgici eseguiti presso l'Unità Operativa Complessa di Ginecologia Oncologica dello stesso Istituto tra il 2010 e il 2018, di pazienti trattate per carcinoma dell'endometrio stadio FIGO I, iperplasia endometriale e altre che avevano subito un'isterectomia totale per patologie benigne extra-endometriali (fibromatosi uterina, patologie annessiali).

Questa selezione di campioni è stata fatta per valutare la patologia endometriale in diversi stadi, dall'assenza di malattia stessa, quindi endometrio fisiologico, fino al cancro conclamato, passando dall'iperplasia endometriale, il tutto con l'obiettivo di identificare le vie di fuga immunitaria attivate nell'evoluzione verso il carcinoma, che potrebbero diventare bersagli di potenziali terapie immunitarie, al fine di poter prevenire l'evoluzione verso gli stadi avanzati di malattia, riattivando una propria risposta immunitaria specifica. I pazienti arruolati in ciascun gruppo sono stati selezionati retrospettivamente da un ampio database.

Criteria di inclusione

- Maggiore età.
- Diagnosi istologica di endometrio sano (in pazienti che hanno eseguito isterectomia totale per patologie benigne extra-endometriali), iperplasia endometriale semplice, adenocarcinoma endometrioide dell'endometrio stadio FIGO I.
- Disponibilità di sufficiente quantità di FFPE.

Criteria di esclusione

- Comorbilità non sufficientemente controllate da un'adeguata terapia medica.
- Infezioni dell'endometrio (endometriti, piometra).

- Tumori sincroni.
- Trattamenti neoadiuvanti.
- Precedente chemioterapia sistemica e/o radioterapia pelvica in anamnesi.
- Terapie ormonali.

Metodi e Procedure

La valutazione immunohistochimica di LOX-1 e NALP3 è stata eseguita su sezioni spesse 2 µm ottenute da FFPE di tessuti endometriali, utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo policlonale di coniglio anti-LOX1 (diluizione di 1:40; Abcam) e anticorpo policlonale di coniglio anti-NALP3 (diluizione 1:100; Novusbio) rispettivamente. Le immunoreazioni sono state rivelate da una tecnica immunoperoxidasi potenziata da streptavidina-biotina (Super Sensitive MultiLink, Leica, Milano, Italia) in un autostainer automatizzato (Bond III, Leica), utilizzando un protocollo di recupero dell'antigene del tampone citrato a pH 6, per entrambi gli anticorpi utilizzati nel nostro studio. Controlli positivi e negativi sono stati inclusi per ogni anticorpo e in ogni lotto di colorazione. L'immunoreattività è stata valutata da due ricercatori (MC e LR, patologo e biologo) e i casi discordanti sono stati successivamente discussi e concordati. L'espressione dei markers analizzati è stata definita in termini di percentuale (ovvero la percentuale di cellule ghiandolari che esprimono quel particolare

marker) e in termini di intensità (punteggio da 1 a 3); inoltre, abbiamo valutato se la colorazione fosse localizzata nel nucleo o nel citoplasma delle cellule.

Analisi Statistica

A causa della scarsa disponibilità di dati presenti in letteratura su questo argomento, non è stato possibile un calcolo adeguato della numerosità campionaria.

ANOVA test è stato utilizzato per evidenziare differenze tra le caratteristiche cliniche dei pazienti nei diversi gruppi in esame.

È stata effettuata un'analisi statistica inferenziale per il confronto tra i risultati dei diversi gruppi.

In dettaglio, il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per analizzare la distribuzione dei dati.

Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney sono stati utilizzati per l'analisi di variabili continue e in particolare per confrontare la percentuale e il punteggio di intensità delle cellule colorate nel tessuto sano, nell'iperplasia endometriale tipica e nel carcinoma endometriale.

I dati sono, quindi, stati espressi come mediana e intervallo. In relazione alle variabili categoriali, il test Chi-quadrato è stato usato per confrontare l'espressione di LOX-1 e NALP3 nei diversi gruppi di pazienti (endometrio sano, iperplasia endometriale tipica e carcinoma endometriale).

Il test di Spearman è stato utilizzato per verificare la potenziale correlazione tra l'espressione di LOX-1 e NALP3 in tutto il campione in esame. La presente associazione è stata successivamente confermata attraverso un test di regressione lineare. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Sono stati ottenuti 41 campioni adeguati di endometrio (FFPE), di 41 pazienti sottoposte a isterectomia totale per diverse motivazioni, con diagnosi finale di: carcinoma endometrioide dell'endometrio (n=12), iperplasia endometriale senza atipie (n=22) ed endometrio fisiologico (n=7) ottenuto da pazienti sottoposte a isterectomia totale per patologie ginecologiche benigne extra-endometriali.

I campioni ottenuti sono stati divisi in tre diversi gruppi: endometrio fisiologico (controlli), iperplasia endometriale senza atipie, carcinoma dell'endometrio. Non sono emerse, tra i 3 gruppi, differenze statisticamente significative in termini di età dei pazienti ($p=0,33$) e di BMI ($p=0,055$).

Le caratteristiche cliniche della popolazione in studio sono rappresentate in tabella 1.

In tutto il campione è stata dimostrata una relazione proporzionale tra l'espressione di LOX-1 e NALP3 dal test di Spearman ($p=0,006$), con un coefficiente di correlazione $r=0,4$. Aumentando l'espressione di LOX-1, NALP3 diminuisce.

Utilizzando il test Chi-quadrato, è stata ottenuta una significatività statistica nell'espressione differenziale di LOX-1 confrontando i controlli, l'iperplasia endometriale e i carcinomi endometriali ($p=0,03$).

CARATTERISTICHE	Endometrio Fisiologico (n 7)	Iperplasia Endometriale (n 22)	Carcinoma Endometriale (n 12)
Età Media ± S.D.	58 ± 13 anni	51,8 ± 10,4	50,7 ± 10,5
BMI medio ± S.D.	23 ± 1 kg/m ²	26,3 ± 5	28,3 ± 4,7
Menopausa			
Si	5	10	9
No	2	12	3
Stadio FIGO			
IA	NA	NA	6
IB			6
Limfoadenectomia			
Non eseguita			6
Pelvica	NA	NA	6
Lombo-aortica			0
Grading			
1			4
2	NA	NA	4
3			4
Istologia			
Endometriode	NA	NA	12

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti arruolati.

NA: non attinente.

LOX-1 è espressa nel 14% dei pazienti con endometrio fisiologico, nel 59% dei casi con iperplasia endometriale, mentre nel gruppo dei carcinomi è espressa nel 75% dei casi (Figura 1), mostrando una gradazione progressiva crescente statisticamente significativa. Per quanto riguarda l'espressione di NALP3, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa confrontando il gruppo di controllo, l'iperplasia endometriale e il carcinoma dell'endometrio; si osserva comunque un trend positivo nell'86% dei casi controllo, nell'82% dei casi di iperplasia e nel 78% dei casi di carcinoma, mostrando una gradazione progressiva decrescente (Figura 1).

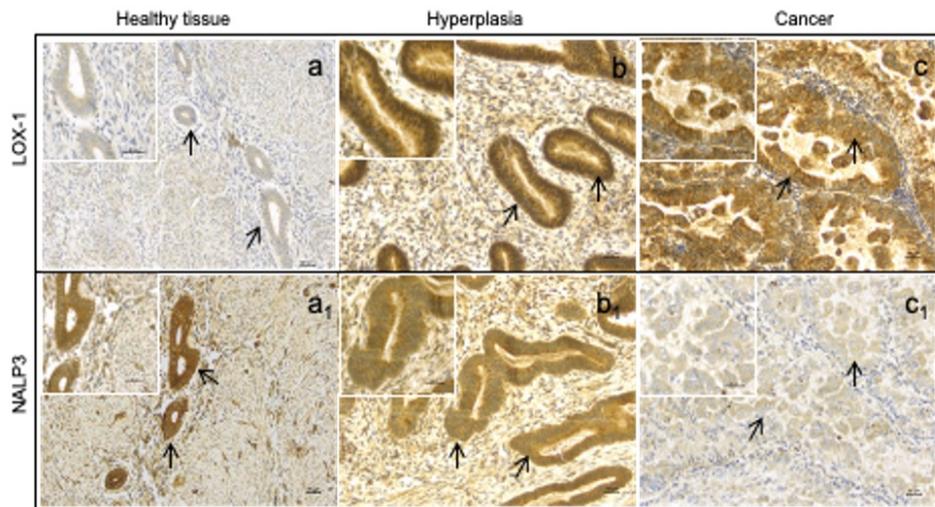


Figure 1. Immunohistochemical staining on formalin-fixed paraffin-embedded samples of endometrial tissue showing expression of LOX-1 and NALP3 markers. The expression of the two markers was assessed on glandular cells (indicated by black arrows) from healthy endometrial samples (a and a₁), with simple hyperplasia (b and b₁) and with cancer (c and c₁). The photographs have been acquired with optical microscope at 20X magnification, each image contains in its white box the respective 40x magnification. Images show that LOX 1 is not expressed in healthy tissue, is mildly expressed in hyperplasia and its expression is enhanced in cancer: the darker the coloration appears, the more severe the EC progression step is. Conversely, NALP3 is expressed more in healthy tissue, mildly expressed in hyperplasia and even less in cancer.

Per quanto riguarda la percentuale di cellule colorate con l'immunostochimica e il punteggio relativo all'intensità della colorazione (intensity score) nei diversi tessuti esaminati, mentre LOX-1 raggiunge una significatività statistica grazie al punteggio di maggiore intensità nel cancro rispetto ai controlli ($p=0,04$) e un trend di maggiore percentuale di cellule colorate nei gruppi di carcinomi e iperplasia endometriale rispetto ai controlli ($p=0,06$), NALP3 raggiunge una significatività statistica per il punteggio di maggiore percentuale di cellule colorate nell'iperplasia endometriale rispetto al cancro ($p=0,04$) (figura 2).

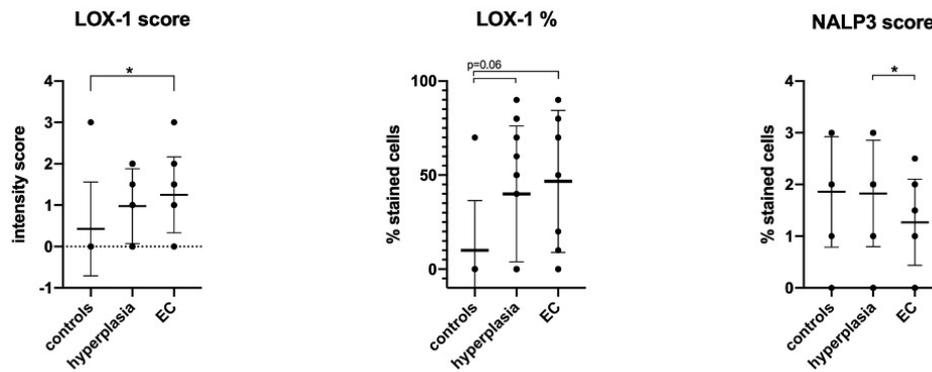


Figure 2. Expression of LOX-1 and NALP3, expressed as % of stained cells and as intensity score in all different groups. Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney test: * $p < 0,05$.

Abbiamo, quindi, selezionato solo le pazienti con carcinoma dell'endometrio e confrontato il grading, l'invasione miometriale e la presenza di invasione degli spazi linfovaskolari con l'espressione di LOX-1 e NALP3: i due marker non risultano essere correlati a nessuna delle caratteristiche di malattia in modo statisticamente significativo.

Abbiamo anche osservato come ci sia una specificità nella localizzazione all'interno della cellula endometriale ghiandolare dell'espressione di NALP3 ($p = 0,06$), ma non di LOX-1, a seconda dell'andamento della patologia, con un 100% di localizzazione citoplasmatica nell'iperplasia e nell'endometrio fisiologico, fino al carcinoma una localizzazione nel 68% dei casi citoplasmatica, nel 18% nella membrana e nel 14% nucleare.

Il 28,6% delle pazienti nel gruppo dei controlli era in età fertile, il 60% nel gruppo dell'iperplasia, e il 33,3% nel gruppo dei carcinomi. Abbiamo confrontato i dati ottenuti all'interno degli stessi gruppi e non sono emerse differenze nell'espressione di LOX-1 e NALP3 tra le pazienti in età fertile e quelle in menopausa.

DISCUSSIONE

I nostri dati suggeriscono che nel carcinoma dell'endometrio, l'espressione di LOX-1 e NALP3 sia modulata secondo diversi passaggi di progressione, che vanno dall'endometrio fisiologico al cancro conclamato [11,18].

Infatti, attraverso la colorazione immunohistochimica, abbiamo osservato che LOX-1 è più espresso nel tessuto tumorale, meno nell'iperplasia, per arrivare ad una colorazione quasi assente nel tessuto endometriale "sano", evidenziando un "grading" che va dal tessuto sano, passa dalle lesioni precancerose, fino ad arrivare al cancro conclamato.

Come accade in altre neoplasie, LOX-1 aumenta nel cancro dell'endometrio, il suo aumento progressivo dall'endometrio fisiologico fino al cancro, suggerisce che questo biomarker possa essere coinvolto nella genesi, nel mantenimento e nella progressione del cancro stesso, quindi che la sua aumentata espressione non sia un effetto passivo, ma una delle chiavi coinvolte nel complesso processo di "immuno-adattamento" oncologico.

Per quanto riguarda l'espressione di NALP3, non abbiamo evidenziato differenze significative tra i tre gruppi, solo osservando la percentuale di cellule colorate, esiste una differenza significativa tra iperplasia e cancro, con una più alta percentuale nel primo gruppo.

Questo dato è in controtendenza, rispetto a quanto riportato in letteratura per altre neoplasie, tuttavia appare in accordo con numerosi studi che dimostrano una maggiore espressione di NALP3 nelle complicanze della gravidanza come

aborto ricorrente e preeclampsia [13-15, 22]. La ridotta espressione di NALP3 potrebbe, quindi, essere legata alla genesi dell'immunotolleranza materno-fetale e nel cancro potrebbe favorire un ambiente anti-infiammatorio, pro-tumorale.

È interessante il dato che indica una diversa localizzazione di NALP3 all'interno della cellula carcinomatosa, studi futuri sono necessari per chiarire le diverse funzioni legate a questa diversa localizzazione, non evidenziata nel cancro e nella patologia benigna.

Selezionando solo le pazienti con carcinoma dell'endometrio e confrontando alcuni importanti fattori prognostici con l'espressione di LOX-1 e NALP3, non sembrano esserci variazioni statisticamente significative. Tuttavia, il numero di pazienti arruolati con carcinoma dell'endometrio è troppo basso per poter eseguire un'adeguata analisi dei sottogruppi e giungere a conclusioni definitive in tal senso.

Dai nostri dati risulta, inoltre, che non ci siano differenze tra le pazienti in menopausa e quelle in età fertile, suggerendo che non vi è alcuna influenza ormonale sull'espressione di LOX-1 e NALP3.

La scelta di questi due biomarcatori per questo studio pilota è stata mirata all'identificazione di potenziali target, per i quali sperimentalmente, sono già state studiate alcune molecole farmacologiche che mirano a modificarne l'espressione genica, la segnalazione o l'attivazione e che quindi, possano garantire un'applicazione clinica in pazienti con questa neoplasia [11,13].

In particolare, per l'inibizione/riduzione delle vie di segnalazione di LOX-1, sono state sviluppate le seguenti tecnologie:

1. Oligonucleotidi antisenso per la modulazione dello splicing con salto dell'esone 5 per la modifica del rapporto mRNA / Loxin MRNA del recettore 1 delle lipoproteine ossidate a bassa densità (OLR1);
2. Un RNA interferente breve e miRNA (miR-let-7-g; miR-24; miR-590-5p) per regolare l'espressione dell'mRNA di OLR1;
3. Anticorpi anti-LOX1;
4. Agenti antiossidanti e antipertensivi per inibire l'attività del recettore LOX-1 riducendo i livelli di lipoproteine ossidate a bassa densità (ox-LDL) [11].

È stato osservato che l'esaurimento di OLR1, il gene che codifica per LOX-1, sopprime la crescita di linee cellulari di carcinoma della mammella, di epatocarcinoma e di cancro della cervice uterina, bloccando la trasformazione morfologica e riducendo la tumorigenicità. OLR1 è specificamente sovra-regolato nel 57% delle cellule tumorali di carcinoma della vescica e della cervice uterina, nell'11% delle cellule tumorali di carcinoma mammario, nel 10% delle cellule del carcinoma polmonare e nel 20% dei carcinomi del colon-retto. Inoltre, l'espressione di LOX-1 era un fattore prognostico significativo in vari tumori, come il cancro alla prostata in stadio avanzato, il cancro del colon-retto e il carcinoma squamoso del polmone non a piccole cellule. La sovra-regolazione di LOX-1 da parte delle LDL di bue porta all'angiogenesi tumorale

e a un aumento della proliferazione cellulare nelle cellule di carcinoma prostatico [11].

La famiglia NALP è stata studiata come potenziale bersaglio terapeutico di alcuni inibitori dell'attivazione del complesso inflammasomico, come il β -idrossibutirrato, i miRNA e l'MCC950 [9].

La disregolazione dell'inflammasoma NLPR3 è coinvolta nella patogenesi e nella progressione del cancro attraverso mi-RNA selezionati, come miR-200, che hanno, come target specifico alcuni geni correlati all'inflammasoma stesso [18]. Inoltre, la mutazione materna nel gene NLRP7 della famiglia NALP causa mole idatiformi ricorrenti, mentre la produzione di NLRP7 da parte del tumore è associata all'invasione miometriale e ad una prognosi sfavorevole nei pazienti con carcinoma dell'endometrio [16]. NLRP7 inibisce la maturazione di IL-1 β mediata dalla caspasi-1, suggerendone una funzione antinfiammatoria [16].

Al contrario, l'inflammasoma NALP3, che è coinvolto nell'immunità innata e nel processo di apoptosi cellulare, può attivare la caspasi-1 e convertire l'interleuchina pro-infiammatoria in molecole di attivazione biologica, come IL-1. L'attivazione di NALP3 nei macrofagi può essere indotta da LOX-1 [17-18]. Nell'aborto ricorrente è stato osservato un aumento significativo dell'attivazione dell'inflammasoma NALP-3 endometriale e una secrezione dipendente dalla caspasi-1 di IL-18 e IL-1 β nei tessuti endometriali [13]. Anche nella preeclampsia è stato dimostrato un aumento dell'espressione genica basale

dei recettori NLRP3 nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), placenta e trofoblasti [14-15].

Una prospettiva futura potrebbe essere quella di stratificare i pazienti in classi di rischio prima dei trattamenti, secondo pattern immunologici ben codificati, ricavati dai campioni istologici di biopsie endometriali e di unirli a fattori prognostici già noti attraverso l'intelligenza artificiale, tutto questo per avere una prognosi "tailored" per ogni paziente e, di conseguenza, un approccio personalizzato alla malattia. Inoltre, i nostri risultati potrebbero portare all'identificazione di bersagli utili, che potrebbero consentire in futuro di svelare la tempistica precisa degli eventi immunologici che si verificano durante la progressione del carcinoma endometriale e, a loro volta, di progettare studi clinici, con farmaci in grado di bloccare la progressione di malattia.

Rivelare, quindi, una sorta di "orologio immunitario" del cancro, per identificare i pazienti a rischio di sviluppare il carcinoma, già dalla lesione precancerosa, ricercando potenziali fattori immunitari prognostici, come LOX-1 e NALP3 sulla biopsia endometriale, potrebbe avere un grande impatto sulla gestione, il trattamento e la prognosi di questa malattia. In tal modo sarebbe anche possibile rimodulare le attuali classi di rischio, basate su fattori prognostici conosciuti, attraverso un "punteggio immunitario".

Questo lavoro è uno studio pilota su due biomarkers dell'immunità innata, fino ad oggi, mai indagati nel carcinoma dell'endometrio, una neoplasia con un'altissima incidenza nel nostro Paese.

Il prossimo passo, seguendo questa linea di ricerca, è quello di aumentare la numerosità del campione oggetto di studio, in modo da ottenere diverse categorie istologiche, per stratificare i diversi tipi di iperplasia endometriale e di cancro, per osservare in questi gruppi le variazioni di LOX-1 e NALP3 e studiarne i polimorfismi.

Sebbene in questo studio preliminare i gruppi fossero omogenei tra loro, aumentare la dimensione campionaria potrebbe ridurre potenziali bias legati alle differenti caratteristiche delle popolazioni in esame, un'analisi multivariata aiuterebbe a chiarire questi dubbi e a indagare il reale ruolo di alcuni fattori confondenti.

Sulla base delle conoscenze dei meccanismi immunitari coinvolti nell'interfaccia materno-fetale, l'utilizzo della trascrittomica, potrebbe contribuire a identificare i pathways molecolari che sono accesi o spenti nella progressione dalle lesioni precoci alla neoplasia avanzata. È, inoltre, essenziale caratterizzare l'infiltrato immunitario, per fornire, il profilo di polarizzazione delle cellule immunitarie più importanti per la funzionalità dell'endometrio e in particolare per la tolleranza immunitaria materno-fetale, come cellule T helper, macrofagi ed NK uterine (uNK). Queste riflessioni saranno da noi, e spero anche da altri gruppi scientifici, utilizzate per future ricerche.

Il nostro obiettivo rimane quello di rilevare uno specifico “orologio immunitario” del cancro, i cui meccanismi sono ancora sconosciuti e molto complessi.

CONSIDERAZIONI ETICHE

I pazienti arruolati hanno rilasciato un consenso informato scritto durante il ricovero, per l'utilizzo del materiale istologico per scopi di ricerca. Il presente studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki, modificata a Tokyo nel 2004, ed è stato approvato dall'Institutional Review Board (IRB) dell'IRCCS Istituto Nazionale Tumori (IRE) "Regina Elena", "Istituti Fisioterapici Ospitalieri" (IFO) (numero di protocollo: R.S. RS1224/19). Tutte le informazioni raccolte sono state rese anonime e de-identificate prima dell'analisi dei dati.

CONTRIBUTI E RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va al dott. Vizza per la supervisione, alla collega Valentina Bruno per il sostegno costante durante tutte le fasi della ricerca e per l'indiscussa competenza in quest'ambito scientifico, alla dott.ssa Carosi M. A. e alla dott.ssa Ronchetti L. per la lavorazione dei campioni biologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Koh WJ, Abu-Rustum NR, Bean S, Bradley K, Campos SM, Cho KR, Chon HS, Chu C, Cohn D, Crispens MA, Damast S, Dorigo O, Eifel PJ, Fisher CM, Frederick P, Gaffney DK, George S, Han E, Higgins S, Huh WK, Lurain JR 3rd, Mariani A, Mutch D, Nagel C, Nekhlyudov L, Fader AN, Remmenga SW, Reynolds RK, Tillmanns T, Ueda S, Wyse E, Yashar CM, McMillian NR, Scavone JL. Uterine Neoplasms, Version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018 Feb;**16**(2):170-199.
2. Scott OW, Tin Tin S, Bigby SM, Elwood JM. Rapid increase in endometrial cancer incidence and ethnic differences in New Zealand. *Cancer Causes Control*. 2019 Feb;**30**(2):121-127.
3. Faria SC, Devine CE, Rao B, Sagebiel T, Bhosale P. Imaging and Staging of Endometrial Cancer. *Semin Ultrasound CT MR*. 2019 Aug;**40**(4):287-294.
4. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet*. 2016 Mar 12;**387**(10023):1094-1108.
5. Singh S, Resnick KE. Lynch Syndrome and Endometrial Cancer. *South Med J*. 2017 Apr;**110**(4):265-269.
6. McDonald ME, Bender DP. Endometrial Cancer: Obesity, Genetics, and Targeted Agents. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2019 Mar;**46**(1):89-105. doi: 10.1016/j.ogc.2018.09.006. PMID: 30683268.

7. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet*. 2005 Aug 6-12;**366**(9484):491-505.
8. Vanderstraeten A, Tuyaerts S, Amant F. The immune system in the normal endometrium and implications for endometrial cancer development. *J Reprod Immunol*. 2015 Jun;**109**:7-16.
9. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc*. 2009 Nov;**84**(11):985-1000.
10. Bruno V, Corrado G, Baci D, Chiofalo B, Carosi MA, Ronchetti L, Piccione E, Albini A, Noonan DM, Piaggio G, Vizza E. Endometrial Cancer Immune Escape Mechanisms: Let Us Learn From the Fetal-Maternal Interface. *Front Oncol*. 2020 Mar 12;**10**:156.
11. Rizzacasa B, Morini E, Pucci S, Murdocca M, Novelli G, Amati F. LOX-1 and Its Splice Variants: A New Challenge for Atherosclerosis and Cancer-Targeted Therapies. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 29;**18**(2):290.
12. Bruno V, Rizzacasa B, Pietropolli A, Capogna MV, Massoud R, Ticconi C, Piccione E, Cortese C, Novelli G, Amati F. OLR1 and Loxin Expression in PBMCs of Women with a History of Unexplained Recurrent Miscarriage: A Pilot Study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017 Jun;**21**(6):363-372.

13. Di Nicuolo F, Specchia M, Trentavizi L, Pontecorvi A, Scambia G, Di Simone N. An Emerging Role of Endometrial Inflammasome in Reproduction: New Therapeutic Approaches. *Protein Pept Lett*. 2018;**25**(5):455-462.
14. Kohli S, Ranjan S, Hoffmann J, Kashif M, Daniel EA, Al-Dabet MM, Bock F, Nazir S, Huebner H, Mertens PR, Fischer KD, Zenclussen AC, Offermanns S, Aharon A, Brenner B, Shahzad K, Ruebner M, Isermann B. Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts. *Blood*. 2016 Oct 27;**128**(17):2153-2164.
15. Matias ML, Romão M, Weel IC, Ribeiro VR, Nunes PR, Borges VT, Araújo JP Jr, Peraçoli JC, de Oliveira L, Peraçoli MT. Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia. *PLoS One*. 2015 Jun 8;**10**(6):e0129095.
16. Ohno S, Kinoshita T, Ohno Y, Minamoto T, Suzuki N, Inoue M, Suda T. Expression of NLRP7 (PYPAF3, NALP7) protein in endometrial cancer tissues. *Anticancer Res*. 2008 Jul-Aug;**28**(4C):2493-7.
17. Takeishi A, Kuranaga E, Miura M. Sensing and reacting to dangers by caspases: Caspase activation via inflammasomes. *Drug Discov Ther*. 2008 Feb;**2**(1):14-23.
18. Glinsky GV. Disease phenocode analysis identifies SNP-guided microRNA maps (MirMaps) associated with human "master" disease genes. *Cell Cycle*. 2008 Dec;**7**(23):3680-94.

19. Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002 Jul;**95**(1):89-100.
20. Alcocer-Gómez E, Castejón-Vega B, López-Sánchez M, Cordero MD. Inflammasomes in Clinical Practice: A Brief Introduction. *Exp Suppl.* 2018;**108**:1-8.
21. Ahechu P, Zozaya G, Martí P, Hernández-Lizoáin JL, Baixauli J, Unamuno X, Frühbeck G, Catalán V. NLRP3 Inflammasome: A Possible Link Between Obesity-Associated Low-Grade Chronic Inflammation and Colorectal Cancer Development. *Front Immunol.* 2018 Dec 11;**9**:2918.
22. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer.* 2018 Nov 17;**17**(1):158.

A mio padre,

che per un tragico destino, non gioirà con me di questo traguardo

accademico.