

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

*CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI*

**XXXII Ciclo**

*(Anni 2017-2020)*

**Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot**

**TESI DI DOTTORATO**

**TITOLO**

**Il glucosio modula l'interazione tra cellule di carcinoma mammario e cellule mesenchimali staminali del tessuto adiposo**

RELATORE

**Chiar.mo**

Prof. Pietro Formisano

Handwritten signature of Pietro Formisano.

CANDIDATA

**Dott. ssa**

Giusy Mosca

# INDICE

<b>CAPITOLO 1</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1. Diabete e Cancro	2
1.1.1. Diabete e Cancro: meccanismi molecolari	3
1.1.2. Iperglicemia e carcinoma mammario	6
1.2. Cancer Stem Cell (CSC)	7
1.3. Microambiente e carcinoma mammario: ruolo del tessuto adiposo	12
1.3.1. Cellule Mesenchimali Staminali (MSC): ruolo nella progressione tumorale	14
1.3.2. Fibroblasti Associati al Tumore (CAF) nel carcinoma mammario	17
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>24</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>24</b>
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>26</b>
<b>3. RISULTATI</b>	<b>26</b>
3.1 Caratteristiche delle pazienti sottoposte a mastoplastica riduttiva	26
3.2 Caratterizzazione delle Ad-MSc isolate da biopsie di tessuto adiposo mammario: immunofenotipo e differenziamento	27
3.3 Effetto del glucosio sull'interazione tra cellule di carcinoma mammario e cellule mesenchimali staminali	29
3.4 Impatto del glucosio e delle Ad-MSc sulla staminalità delle cellule tumorali	33

3.5	Impatto del glucosio e delle MCF7 sulla transdifferenziazione delle Ad-MSc	34
3.6	Ruolo del glucosio e delle Ad-MSc nella formazione delle Mammosfere	35
3.7	Il glucosio modifica il cross-talk tra tumore-stroma nelle colture in 3D	37
 <b>CAPITOLO 4</b>		<b>40</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b>		<b>40</b>
4.1	Isolamento delle MSc	40
4.2	Colture Cellulari	40
4.3	Differenziamento adipocitario ed osteogenico	42
4.4	Colture 2D	43
4.5	Colture 3D: mammosfere	44
4.6	Citofluorimetria	44
4.7	Estrazione RNA	45
4.8	Retrotrascrizione, PCR ed elettroforesi su gel di agarosio	46
4.9	Quantitative Real-Time PCR	48
4.10	Procedimenti statistici	49
 <b>CAPITOLO 5</b>		<b>50</b>
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>		<b>50</b>

**7. REFERENZE**

**56**

**8. LISTA PUBBLICAZIONI**

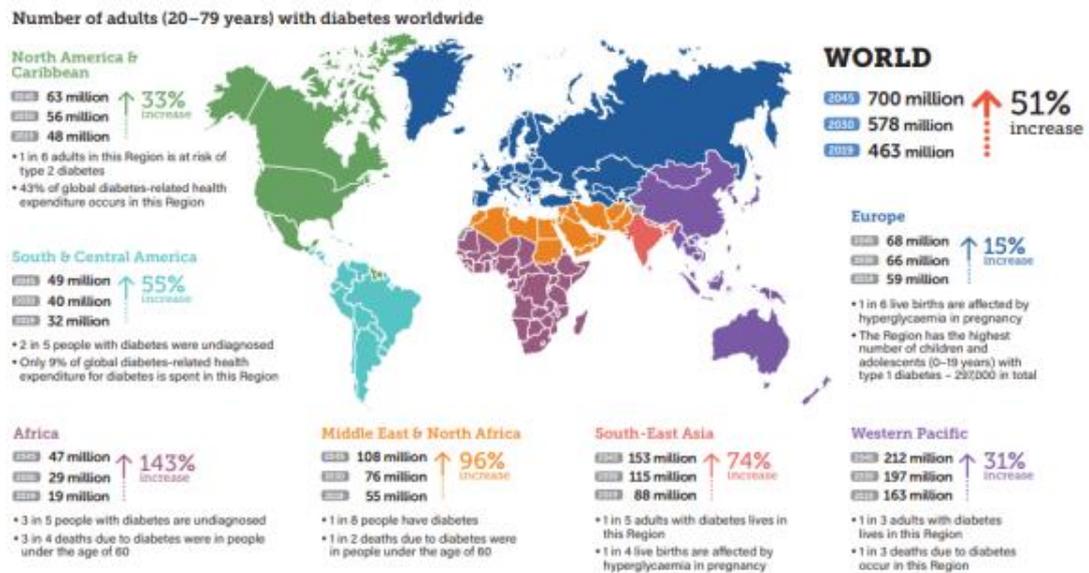
**74**

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 Diabete e Cancro

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il diabete mellito è un gruppo di disordini metabolici a diversa eziologia caratterizzati da iperglicemia cronica associata ad alterazioni del metabolismo glucidico, lipidico e proteico, secondaria a difetti di secrezione e/o azione insulinica. La diffusione del diabete è tale da aver raggiunto proporzioni epidemiche; secondo l'International Diabetes Federation (IDF) 463 milioni di persone di età compresa tra 20 e 79 anni sono attualmente affette da diabete e si prevede che entro il 2045 oltre 700 milioni di individui svilupperanno tale condizione (1).



*Figura 1. Stime e proiezioni a livello mondiale di soggetti diabetici secondo l'International Diabetes Federation 2019*

Secondo l'American Diabetes Association (ADA), le due più ampie categorie in cui sono classificabili la maggior parte dei casi di diabete sono: il diabete mellito di tipo 1 (DM1) e il diabete mellito di tipo 2 (DM2).

Il DM1 comprende il 5-10% di tutti i pazienti diabetici ed è il risultato di una distruzione autoimmune e cellulo-mediata delle  $\beta$ -cellule pancreatiche che porta ad un deficit di insulina con tendenza alla chetoacidosi; risulta essere legato a fattori genetici ed ambientali. Il DM2 in genere compare dopo la pubertà e riguarda circa il 90-95% dei pazienti diabetici caratterizzati dalla presenza di insulino-resistenza; per questo motivo tale forma non prevede, se non in alcuni casi, il trattamento insulinico. Un'apprezzabile parte di soggetti affetti da DM2 risulta obesa, ed è la stessa obesità a rappresentare una causa di insulino-resistenza. Spesso il DM2 è dovuto ad una predisposizione genetica ma anche ad una forte componente ambientale. Queste cause tuttavia necessitano di ulteriori studi per essere chiaramente definite (2).

I pazienti diabetici presentano un aumentato rischio di sviluppare altre gravi patologie. In particolare, l'iperglicemia cronica che caratterizza il diabete, può indurre danni a lungo termine e disfunzioni a livello di vari organi come occhi, reni, nervi, cuore e vasi sanguigni (3). Il diabete è attualmente la causa principale di cecità, insufficienza renale ed amputazione non traumatica degli arti inferiori; rappresenta poi la causa predominante di malattia coronarica, ictus ed insufficienza vascolare periferica (4).

Inoltre la deregolazione metabolica e l'iperglicemia cronica associata al diabete possono, sia direttamente che indirettamente, contribuire all'insorgenza ed alla progressione del cancro (5,6).

### **1.1.1 Diabete e cancro: meccanismi molecolari**

Diversi studi hanno indicato che soggetti affetti da diabete mellito presentano un aumentato rischio di sviluppare vari tipi di tumori (fegato, pancreas, rene, endometrio, colon-retto, vescica, mammella e linfoma di Hodgkin). L'aumento del rischio oscilla tra il 20% per il carcinoma della mammella sino al 250% per il carcinoma del fegato e dell'endometrio, suggerendo quindi una notevole variabilità

nell'associazione tra diabete e le varie forme di tumore (7). Indipendentemente dalla relazione tra diabete e rischio di neoplasia, vi è un effetto della malattia diabetica sulla prognosi del tumore (8,9). Una metanalisi eseguita su 21 studi ha calcolato infatti un possibile aumento del 40% del rischio di mortalità da neoplasia in soggetti con preesistente malattia diabetica (10). I potenziali meccanismi coinvolti nella correlazione diabete-cancro sono: iperglicemia, obesità, insulino-resistenza e infiammazione cronica: (Figura 2)

- ***Iperglicemia***

Il diabete è caratterizzato da un patologico e progressivo incremento della glicemia e il peggioramento della tolleranza glucidica sembra correlare con il rischio neoplastico (11,12). Pertanto, l'aumento delle concentrazioni circolanti di glucosio potrebbe favorire la crescita della cellula cancerosa. Diversi meccanismi sembrano essere coinvolti in questo processo. Secondo l'ipotesi di Warburg, la cellula neoplastica è ampiamente dipendente dall'energia generata dal metabolismo glicolitico (13); l'utilizzazione incompleta del glucosio nella glicolisi aerobica è un processo poco efficiente poiché produce una quantità minore di ATP rispetto a quella prodotta con il ciclo di Krebs. Tuttavia, la glicolisi aerobica fa risparmiare alla cellula neoplastica substrati che utilizzerà per la sintesi di molecole coinvolte nella duplicazione cellulare, quali i lipidi per le membrane cellulari e i nucleotidi per la sintesi del DNA. Quindi la sovrabbondanza di nutrienti può favorire la proliferazione cellulare, al contrario le condizioni che abbassano la glicemia o che attivano l'*AMP-activated kinase activity* (AMPK), sensore dell'energia, come la metformina, sono efficaci nel ridurre l'incidenza di tumori (14). L'iperglicemia si associa anche a un aumento dei prodotti di glicazione avanzata (*advanced glycation endproducts*, AGE) e attivazione di processi infiammatori che possono favorire la trasformazione cellulare in senso neoplastico (15). Oltre a un effetto metabolico, l'iperglicemia è in grado di modulare la trascrizione di segnali intracellulari come la *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) che aumentano la sintesi delle specie reattive

dell'ossigeno (16) e, quindi generare un potenziale danno a livello del DNA.

- ***Obesità***

Oltre l'80% dei pazienti con diabete di tipo 2 è obeso. L'eccesso di adiposità è tipicamente associato a una marcata attivazione della risposta infiammatoria e a un elevato rilascio di adipochine. (17) In soggetti obesi, inoltre, aumenta il rilascio di acidi grassi liberi con peggioramento della sensibilità insulinica, concomitante iperinsulinemia e aumento dello stress ossidativo. L'aumento del tessuto adiposo si associa anche a una maggiore espressione e attività delle aromatasi con conseguente attivazione della conversione degli androgeni in estrogeni che a loro volta sono correlati con il rischio di cancro alla mammella (18).

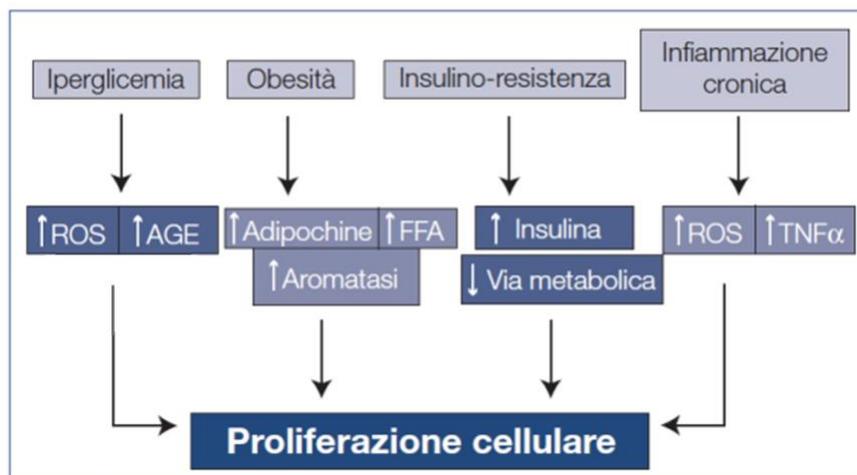
- ***Infiammazione cronica e stress ossidativo***

Le alterazioni metaboliche che caratterizzano i pazienti diabetici, aumentano lo stress ossidativo e causano una condizione pro-infiammatoria permanente. Quest'ultima se diviene cronica riduce le capacità antiossidanti, inducendo le cellule più suscettibili a trasformazione neoplastica. Infatti, l'elevata produzione di diversi radicali liberi generano potenti specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono danneggiare il DNA tramite ossidazione diretta o alterando i meccanismi di riparazione dell'acido nucleico (19). Un potenziale fattore correlato all'insulino-resistenza che genera infiammazione cronica in soggetti diabetici è la presenza di alti livelli della citochina proinfiammatoria TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) prodotta dal tessuto adiposo. Essa infatti è associata allo sviluppo e progressione di molti tumori attraverso l'attivazione di NFkappaB (*nuclear factor-kappa B*) che media molti degli effetti pro-tumorigenici del TNF $\alpha$  (20)

- ***Insulina e insulino-resistenza***

L'insulina, legandosi al proprio recettore di membrana (IR) esplica azioni metaboliche e mitogene attivando due vie intra-cellulari principali: la via

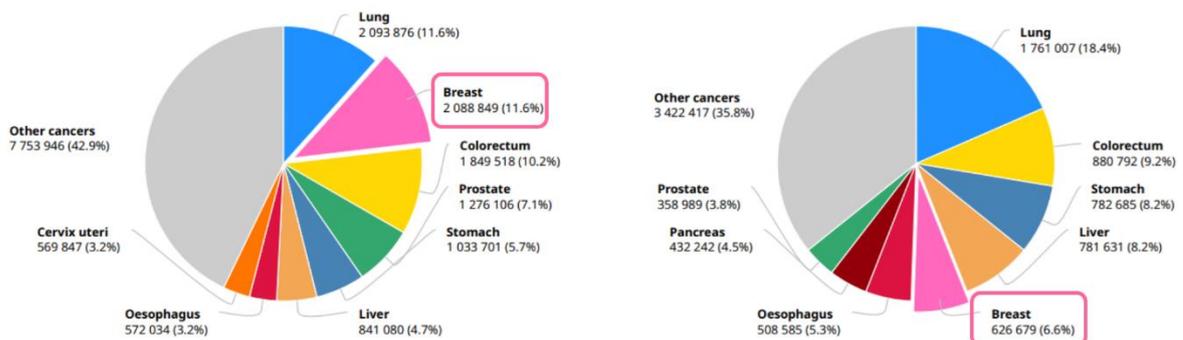
prevalentemente metabolica, mediata dalla fosfo-inositolo-3 chinasi (PI3-K) e la via prevalentemente mitogena, mediata dalla MAP-chinasi (MAPK). L'insulino-resistenza, presente nel diabete di tipo 2 e obesità, è caratterizzata da un difetto selettivo della via metabolica, mentre la via mitogena è relativamente integra e quindi capace di rispondere allo stimolo insulinico. L'iperinsulinemia compensatoria che si instaura nelle condizioni di insulino-resistenza cronica induce un'attivazione anche della via mitogena, favorendo la crescita cellulare e potenzialmente quella tumorale (21). L'insulina esplica inoltre un'azione indiretta sullo sviluppo neoplastico attraverso l'incremento dell'attività dell'IGF1, anch'esso importante agente mitogeno (22). L'IGF1 esprime la sua azione mediante l'interazione col suo recettore ed è regolato da un gruppo di proteine, le IGF1 Binding Proteins (IGF1BPs), le quali stabilizzano l'IGF1 circolante rendendolo disponibile per il legame col suo recettore (23). L'aumento cronico dei livelli insulinici porta ad una riduzione della sintesi e quindi dei livelli ematici di IGF1BPs determinando un incremento della biodisponibilità di IGF1 (24). Inoltre, l'aumento delle concentrazioni di insulina e di IGF1 riduce la sintesi di globuline che legano gli ormoni sessuali, causando così un incremento dei livelli di estradiolo e testosterone (nelle donne). L'aumento degli ormoni sessuali, in particolare degli estrogeni, è fortemente associato al tumore al seno e all'endometrio nel periodo post-menopausa (25).



**Figura 2. I potenziali meccanismi coinvolti nella correlazione diabete-cancro**

### 1.1.2 Carcinoma mammario e Iperglicemia

Il cancro alla mammella è la più comune neoplasia maligna femminile con la più alta incidenza nei paesi industrializzati (26) e rappresenta la prima causa di morte per cancro nelle donne e la terza (tra uomini e donne) dopo il tumore polmonare e al colon. Nel 2018 sono stati diagnosticati circa 2,1 milioni di casi di tumori al seno e circa 600.000 morti con tale malattia (27) (Figura 3).



**Figura 3. Stima mondiale del 2018 dei casi di cancro e della mortalità ad esso associato (Globocan 2018)**

Un gran numero di studi di coorte (28-32) e caso-controllo (33,34) hanno riportato che pazienti con DM2 presentano un aumento del rischio di sviluppare il carcinoma mammario (35) e che oltre il 16% di soggetti affetti da cancro al seno presenta DM2 o alterata tolleranza al glucosio (36,37). Alcuni studi epidemiologici hanno mostrato anche una diretta associazione tra rischio di tumore alla mammella ed il consumo di cibi dolci ad alto indice glicemico (38-41) ed è stato inoltre dimostrato che un'elevata assunzione di carboidrati è associata ad una riduzione della sopravvivenza nelle donne in cui è stato diagnosticato un carcinoma mammario nello stadio iniziale (42). La mortalità dovuta al cancro è geograficamente correlata con un elevato consumo di zuccheri nella dieta. Infatti, i paesi caratterizzati dal più alto consumo di zuccheri presentano i tassi di mortalità più elevati per il carcinoma mammario, indipendentemente dalle altre variabili (43,44).

Sebbene il cancro al seno rappresenti la più comune forma di tumore nelle donne (45), e numerosi studi ne supportino fortemente l'associazione con il diabete, gli effetti diretti ed indiretti del glucosio sulle cellule cancerose sono ancora in parte inesplorati ed ulteriori studi sono necessari per chiarire le vie di segnalazione che sono coinvolte ed il loro meccanismi di regolazione (46).

## **1.2 CANCER STEM CELLS (CSC)**

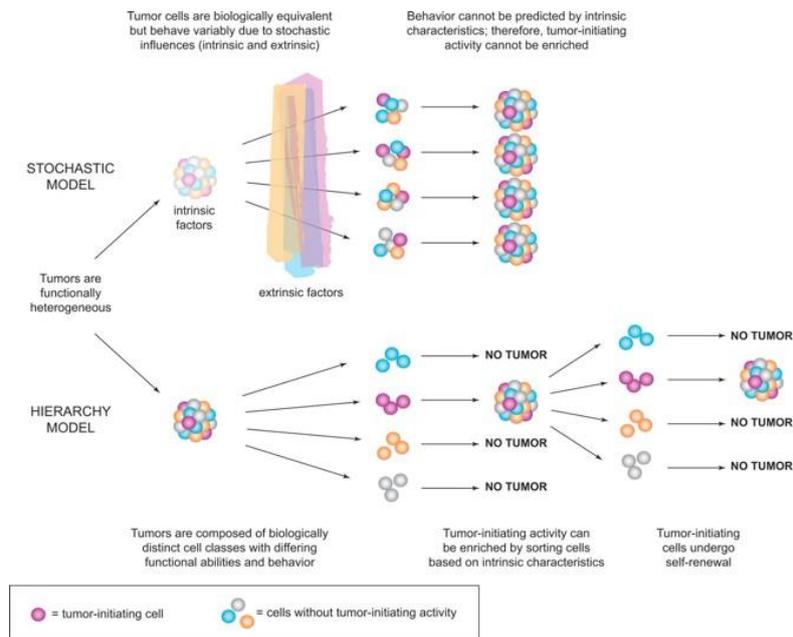
Nonostante gli enormi progressi relativi alla conoscenza della biologia tumorale, alcuni quesiti rimangono ancora irrisolti e tra esse vi è la questione della genesi del cancro. Il tumore si origina, quando eventi genetici ed epigenetici determinano la perdita dei sistemi di controllo del ciclo cellulare interferendo con il suo corretto svolgimento e determinando il passaggio dallo stato di integrità allo stato di instabilità genomica. Questa condizione è basilare per la trasformazione cellulare poiché favorisce l'acquisizione progressiva di nuove mutazioni. Meccanismi cellulari che intervengono nel mantenimento dell'integrità del genoma, sia a livello di controllo del danno del DNA, sia a livello del controllo della distribuzione dei cromosomi durante la mitosi, contrastano costantemente il processo neoplastico. A tale riguardo sono stati proposti diversi modelli.

Per gran parte del ventesimo secolo, l'iniziazione e la progressione dei tumori è stata spiegata attraverso il modello stocastico. Esso sostiene che nell'ambito di un tessuto tutte le cellule siano in grado potenzialmente di dar luogo alla formazione di un tumore in seguito all'acquisizione di mutazioni, impedendo così di poter prevedere quale cellula sia responsabile dell'iniziazione.

Il modello dell'evoluzione clonale ipotizza invece che un tumore derivi da una singola cellula, la quale continua nel tempo ad acquisire nuove mutazioni, originando cloni a proliferazione rapida che hanno la meglio sugli altri. Questo processo seleziona i tipi cellulari più adatti alla crescita illimitata in un determinato ambiente, pertanto i cloni predominanti mantengono il tumore e possiedono la capacità di iniziare la tumorigenesi se impiantati in topi immunodepressi.

Le due ipotesi potrebbero fondersi supponendo che la cellula di origine vada incontro ad una evoluzione clonale e acquisendo una serie di mutazioni, inizi a sviluppare il tumore, con la potenziale collaborazione di elementi stromali, che promuovono la crescita neoplastica.

Negli ultimi anni è stato proposto un altro modello, il modello gerarchico, che al contrario di quello stocastico, sostiene che il cancro si sviluppi a partire da una sottopopolazione cellulare rappresentata da cellule staminali normali mutate. Tale pool cellulare consiste in cellule staminali del cancro (*cancer stem cells, CSCs*) o cellule iniziatrici del tumore. Le CSC possiedono la capacità di auto-rinnovarsi (self-renewal), che garantisce l'eterogeneità gerarchica di alcuni tumori e gioca un ruolo cruciale nello sviluppo, nella progressione e nel mantenimento della neoplasia (47). Inoltre, le CSC sarebbero responsabili non solo dello sviluppo neoplastico ma anche dell'aumento dell'aggressività, della recidività e delle metastasi (48).



**Figura 4. Genesi del cancro: il modello stocastico e il modello delle CSC. (49)**

Le CSC condividono con le cellule staminali normali alcune caratteristiche come la presenza di marcatori di superficie cellulare, la capacità di auto-rinnovarsi e di proliferare indefinitamente, e possono dare origine a progenie diverse utilizzando stesse vie di segnalazioni (50).

Analogamente alle cellule staminali normali, le CSC mostrano elevati livelli dei fattori trascrizionali Oct4, Sox2 e Nanog, regolatori chiave del mantenimento della multipotenza e del self-renewal delle cellule staminali normali. Tali geni regolano la loro stessa espressione e sono implicati nella progressione del cancro, oltre che essere biomarcatori di CSC (51). È stato infatti dimostrato in carcinoma mammari che l'elevata espressione di OCT4 induce l'attivazione a valle dei geni bersaglio NANOG e SOX2, promuovendo il *self-renewal* delle CSC favorendo così la tumorigenesi (52).

Le CSC sono estremamente resistenti alla chemioterapia e alla radioterapia e costituiscono in tal modo una piccola riserva di cellule responsabili delle recidive tumorali e della formazione di metastasi. Tale farmaco-resistenza sarebbe legata ad una maggiore espressione di pompe di membrana implicate nell'espellere gli agenti chemioterapici dalle cellule, a meccanismi di riparazione del DNA molto attivi e a vie di inattivazione dei farmaci più sviluppate (53).

Alcuni autori hanno dimostrato che le CSC derivino da cellule staminali adulte mutate (54) sostenendo che, tali cellule, possono causare tumorigenesi alterando i pathways che regolano l'autorinnovamento. Esse infatti impiegano, nel processo oncogenico, gli stessi pathways coinvolti nel self-renewal delle cellule staminali adulte, le quali sono normalmente presenti nei tessuti e sono responsabili del loro regolare rinnovamento.

Come le cellule staminali adulte, anche le CSC sono state originariamente identificate nel sistema ematopoietico. Le prime evidenze sulla loro esistenza sono state ottenute negli anni '90, grazie a studi sulla leucemia mieloide acuta (AML). *Lapidot* e i suoi colleghi dimostrarono che solo una piccola popolazione di cellule tumorali leucemiche, con fenotipo CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, aveva la capacità di formare il tumore una volta inoculata in un topo NOD/SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*) (55). Il fenotipo di queste cellule era simile a quello delle

cellule staminali normali ematopoietiche e suggerdo quindi, che esse potevano derivare da cellule staminali adulte mutate (56).

Successivamente, le CSC sono state individuate anche nei tumori solidi mediante l'identificazione di marcatori di superfici differenti, in particolare nel carcinoma alla mammella ( $CD44^{high}CD24^{-/low}$ ) (57), nei tumori cerebrali ( $CD133^{+}$ ) (58), nel carcinoma a cellule squamose orale ( $CD44^{high}$ ) (59) nel cancro del pancreas ( $CD44^{+}CD24^{+}ESA^{+}$ ) (60) e nel cancro alla prostata ( $CD44^{+}$ ) (61).

*Al-Hajj* e i suoi collaboratori furono i primi nel 2007 a identificare e isolare una particolare sottopopolazione tumorale nel carcinoma mammario. Tali cellule avevano la capacità, *in vivo*, di formare il tumore in topi immunocompromessi, mentre la restante popolazione cellulare del tumore possedeva tale capacità solo quando iniettata ad alte dosi. Inoculando infatti circa 100 cellule con fenotipo  $CD44^{high}/CD24^{-/low}$  si generava il tumore, al contrario mediante lo stesso approccio la popolazione tumorale con fenotipo differente non era in grado di formarlo (57).

Risultati simili sono stati ottenuti nei tumori cerebrali positive per il marcatore CD133 (57), tumore polmonare (62), il tumore del colon (63), dell'ovaio (64), del pancreas (60) e della prostata (65).

L'insieme di tutti questi risultati ha quindi portato attualmente a favorire il modello delle CSC rispetto al modello stocastico. Mentre, il modello stocastico prevede che tutte le cellule del tumore siano capaci, teoricamente, di dare origine e promuovere la crescita tumorale, il modello della CSC propone, invece, che solo una rara popolazione di cellule ne sia capace, ma i due modelli non sono necessariamente mutualmente esclusivi e caratteristiche del modello stocastico possono essere introdotte nelle proprietà delle CSC (66).

Data l'ampia diversità delle proprietà attribuite alle cellule staminali tumorali, l'Associazione Americana per la Ricerca sul Cancro (AACR), nel 2006, ha pensato di uniformare il concetto definendo la cellula staminale tumorale come "una cellula all'interno del tumore che possiede la capacità di self-renewal e causa l'eterogeneità cellulare all'interno della massa tumorale" (67).

Un'altra caratteristica delle CSC, che le accomuna alle normali cellule staminali, è la divisione cellulare. Entrambe possono andare incontro a due tipi differenti: simmetrica o asimmetrica. Mediante la divisione asimmetrica la cellula staminale dà origine a due cellule figlie diverse, una staminale e l'altra che invece procede verso la differenziazione per mantenere l'omeostasi del tessuto. Tale strategia permette, con un'unica divisione, di gestire sia il comparto staminale che quello delle cellule differenziate.

In situazioni particolari, quali danno tissutale, le cellule staminali vanno incontro a divisione simmetrica, la quale darà origine a due cellule figlie uguali che saranno entrambi staminali oppure andranno incontro a differenziazione, perdendo di conseguenza le caratteristiche di staminalità (68). I meccanismi che mantengono l'equilibrio tra queste due strategie o che permettono la scelta di una rispetto l'altra sono stati finora poco indagati bensì rappresentano un punto critico e fondamentale nella differenza tra CS e una CSC. Uno studio sostiene che la decisione sia regolata da coattivatori della catenina, dalla proteina CBP (*CREB-binding protein*) e dalla p300. Un incremento di trascrizione di CBP/catenina a discapito di quella di p300/catenina incrementa il numero delle divisioni simmetriche e questa opzione sembra essere favorita dalle CSC rispetto alle CS adulte (69).

Un'altra caratteristica peculiare delle CSC è la capacità di formare *in vitro* le cosiddette sfere. L'identificazione e isolamento dei CSC attraverso la coltivazione della sfera tumorale non richiede una conoscenza di base sulle distintive molecole di superficie cellulare o altri marcatori specifici, ma consiste nell'osservare *in vitro* la tendenza delle cellule tumorali a crescere in sospensione in piastre Ultra-Low-Attachment e tale metodica è considerata un utile test per valutare la capacità delle cellule cancerose di auto-rinnovarsi (70).

Nel 2003 *Dontu e colleghi* hanno appunto sviluppato una nuova tecnica che ha permesso, per la prima volta, di coltivare cellule staminali mammarie in un sistema di coltura tridimensionale per ottenere aggregati sferici chiamati "mammosfere". È stato dimostrato che le mammosfere sono altamente arricchite di cellule indifferenziate, come dimostrato dalla capacità delle singole cellule, isolate dalle mammosfere, di generare colonie di diversi tipi cellulari (71).

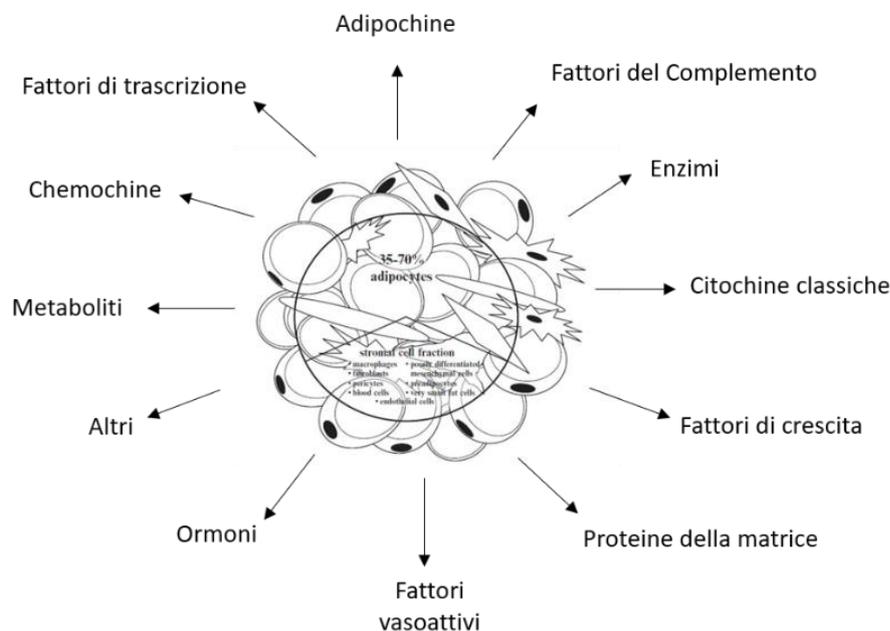
La tecnica delle colture 3D è oggi ampiamente utilizzata in quanto ritenuta una metodica *in vitro* più fisiologica e che può meglio mimare la struttura tumorale in vivo, è così rendere più efficiente lo studio delle CSC e dei tumori in generale compreso il carcinoma alla mammella.

### **1.3 Microambiente Tumorale: Tessuto Adiposo**

Negli ultimi anni è stato dimostrato il tumore oltre a svilupparsi in seguito a cambiamenti epigenetici e genetici può dipendere anche dalla comunicazione tra cellule epiteliali tumorali e cellule stromali circostanti che costituiscono il microambiente tumorale (72). Il tessuto adiposo rappresenta una componente importante del microambiente canceroso, in particolare per il cancro al seno (73,74). Esso è un tessuto connettivo lasso, ampiamente vascolarizzato ed innervato, caratterizzato da un'ampia eterogeneità cellulare; è composto per circa un terzo da adipociti maturi e, per i restanti due terzi, dalla frazione vasculo-stromale che comprende cellule staminali mesenchimali (Ad-MSCs; Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells), cellule T regolatorie, precursori delle cellule endoteliali, fibroblasti, cellule muscolari lisce, periciti, macrofagi e preadipociti in vari stadi di maturazione (75-77) (Figura 5).

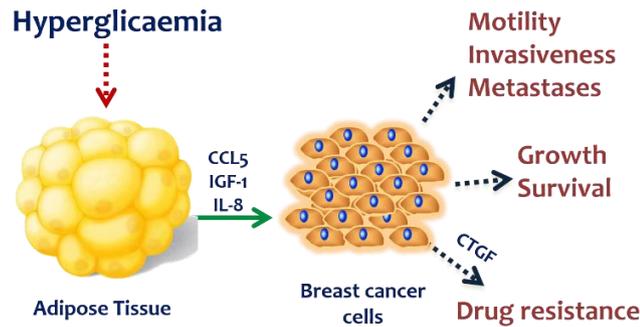
Il tessuto adiposo è un organo endocrino bioattivo che secerne fattori solubili e contribuisce in modo significativo alla composizione della matrice extracellulare (ECM) (78). È coinvolto inoltre nella regolazione delle funzioni cellulari attraverso una complessa rete di segnali endocrini, paracrini e autocrini che inducono la risposta di molti tessuti, inclusi l'ipotalamo, il pancreas, il fegato, il muscolo scheletrico, i reni, l'endotelio e il sistema immunitario. Dunque, il tessuto adiposo influenza l'attività dell'intero organismo intervenendo sia in processi fisiologici, quali regolazione del fabbisogno energetico, mantenimento dell'omeostasi metabolica e risposta immunitaria, che patologici, quali malattie cardio-vascolari, infiammazione cronica e cancro (79,80). Vari studi dimostrano che il tessuto adiposo ha un impatto significativo sulla progressione del cancro al seno mediante la secrezione di fattori di crescita e citochine (81,82) i quali influenzerebbero molti aspetti della tumorigenesi,

dall'invasione locale all'insorgenza di metastasi in siti distanti ricchi di grasso (come il midollo osseo), all'alterata risposta ai farmaci (83). Ad oggi, sono stati identificati almeno 100 fattori diversi secreti dagli adipociti, tra i quali citochine, chemochine, ormoni proteici, come adiponectina e resistina, componenti del sistema renina-angiotensina e della via del complemento, prostaglandine e ormoni steroidei e tale meccanismo che vede protagonista il tessuto adiposo nella crescita e nello sviluppo di metastasi, è chiamato "Adiponciosi" (84) (Figura 6).



**Figura 5. Componenti e Fattori rilasciati dal tessuto adiposo** (modificata da 85)

È stato dimostrato che il tessuto adiposo risente delle alterazioni metaboliche associate al DM2 e all'obesità con conseguente risposta secretoria di fattori che possono contribuire alla progressione tumorale. Infatti, recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che gli adipociti rispondono ad elevate concentrazioni di glucosio e acidi grassi e rilasciano una varietà di molecole, come l'IGF-1, la chemochina CCL5 e l'interleuchina 8 (IL-8), promuovendo la proliferazione, la migrazione, l'invasività e la resistenza ai farmaci di cellule di carcinoma mammario (86-88) (Figura 6).

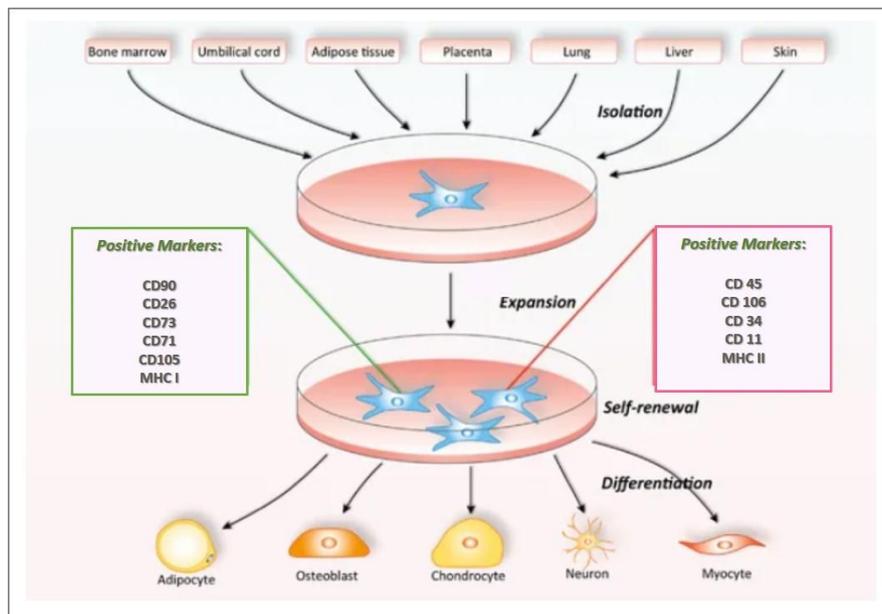


*Figura 6: Risposta adipocitaria agli stimoli metabolici*

### 1.3.1 Cellule Mesenchimali Staminali (MSC): ruolo nella progressione tumorale

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) costituiscono un'altra componente importante del tessuto adiposo. Sono precursori non ematopoietici e furono isolati inizialmente dal midollo osseo come elementi aderenti, altamente proliferanti, dotati di potenziale di self-renewal a lungo termine e di differenziazione multilineare in diversi tessuti di origine mesenchimale (89,90). La loro facilità nell'isolarle e coltivarle ed il loro elevato potenziale di espansione *ex vivo* fanno delle MSC una interessante risorsa utilizzabile in una vasta gamma di applicazioni cliniche nel contesto della terapia cellulare e genica ed in medicina rigenerativa (91); è stato infatti riportato che le MSC contribuiscono alla riparazione dei tessuti attraverso la differenziazione, fusione cellulare o la secrezione di citochine e fattori di crescita (92). Le MSC derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio, che si differenzia intorno al terzo mese di gestazione e da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo, tra cui il mesenchima. Quest'ultimo è composto da un'abbondante matrice extracellulare in cui sono immerse le cellule mesenchimali. Il tessuto mesenchimale è presente in tutti gli organi per garantire supporto strutturale e per regolare il traffico cellulare attraverso i tessuti. Le MSC possono originare anche da alcune porzioni di ectoderma della cresta neurale e di endoderma della placca precordale. Esse sono in grado di differenziare non solo in tessuti di origine mesenchimale, tra cui stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo

e muscolare scheletrico, mesoderma viscerale e cellule endoteliali ma anche in cellule di origine non mesodermica quali neuroni, cellule epiteliali di cute e tubo digerente, fegato e polmone (93-96). (Figura 7).

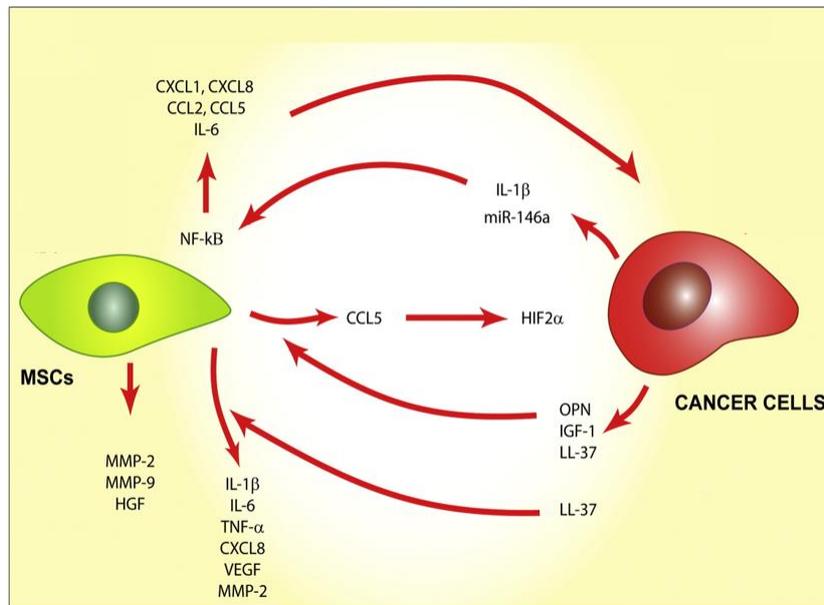


**Figura 7:** Isolamento, espansione e differenziamento delle MSC. (modificata da 97)

Dalla frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo è possibile estrarre cellule che presentano caratteristiche fenotipiche e plastiche, quali la morfologia simil-fibroblastica, l'immunofenotipo, la capacità di isolamento, la frequenza di unità formanti colonie, e capacità differenziative simili alle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo (98). A differenza del midollo osseo, il grasso è abbondantemente disponibile e facilmente accessibile e può produrre quantità significativamente più elevate di cellule, il che rende le MSC del tessuto adiposo molto attraenti per la medicina rigenerativa (99). Una fonte adiposa di MSC è sicuramente rappresentata dal tessuto adiposo della ghiandola mammaria ed è stato osservato che le MSC isolate da tale adipe esprimono marcatori di superficie simili

alle MSC addominali (CD29, CD73, CD90 e CD105-positive e CD14, CD31, CD34 e CD45-negative) (100) oltre che condividere profili genetici simili (101). Le MSC sono in grado di ospitare siti di lesioni e infiammazioni dei tessuti (102), nonché il microambiente tumorale (103,104). Tuttavia, anche se la letteratura mostra un effetto controverso delle MSC sul fenotipo canceroso (105-107), molte evidenze dimostrano che esse promuovono lo sviluppo e la progressione del tumore, nonché la recidiva in diversi tipi di cancro incluso il carcinoma alla mammella (108-113). Cellule tumorali e MSC stabiliscono interazioni reciproche che causano modificazioni trascrizionali, secretorie e fenotipiche, responsabili della progressione neoplastica.

Le MSC possono esercitare effetti protumorigenici in modo paracrino, secernendo fattori che agiscono direttamente con i rispettivi recettori espressi sulle cellule maligne. I fattori maggiormente coinvolti sono CXCL1, CXCL2, CXCL12, IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1 e fattori di crescita come l'EGF (114,115). L'asse CXCL12/CXCR4 contribuisce alla formazione del tumore, MSC-mediato, su diversi modelli sperimentali, tra cui il melanoma, il cancro al seno e alla prostata (116). Le MSC inoltre sono a loro volta stimulate dalle cellule tumorali a secernere fattori responsabili della progressione tumorale. Una molecola particolarmente implicata è la chemochina CCL5/RANTES, la cui secrezione *de novo*, guidata dalle cellule cancerose, è responsabile dell'induzione e dell'aumento della motilità, invasione e capacità metastatica delle cellule neoplastiche nel carcinoma mammario (117).



*Figura 8. Fattori rilasciati dalle MSC che favoriscono la crescita tumorale (modificato da 118)*

### 1.3.2 Fibroblasti Associati al Tumore (CAF) nel carcinoma mammario

I fibroblasti sono cellule specializzate che formano la componente cellulare di base del tessuto connettivo e contribuiscono alla sua integrità strutturale (119). Essi svolgono un ruolo importante nella guarigione delle ferite, nella regolazione della differenziazione epiteliale e dell'infiammazione (120). Negli organi sani, i fibroblasti hanno un basso indice di proliferazione e una bassa capacità metabolica. Al contrario, durante la guarigione delle ferite e nei tumori, i fibroblasti si attivano, iniziano a proliferare, e secernono maggiori quantità di componenti della matrice extra-cellulare (ECM) acquisendo caratteristiche contrattili (121). Nei tumori, questi fibroblasti modificati sono noti come Fibroblasti Associati al Cancro (CAF). I CAF presentano una struttura mesenchimale a forma di fuso con nuclei dentellati e miofilamenti periferici (122). Essi furono identificati per la prima volta da Gabbiani et al., attraverso studi sulla guarigione delle ferite (123) e definite da Kalluri e Zeisberg come “fibroblasti attivati all'interno di lesioni desmoplastiche”, le quali sono associate a tumori maligni ed esprimono un marcatore specifico quale  $\alpha$ -SMA

(Alpha-Smooth Muscle Actin) (124). La maggior parte dei CAF sono fibroblasti attivi e solo una piccola parte resta inattiva; infatti nei tumori mammari l'80% dei fibroblasti è in forma attiva (125). I CAF svolgono nel tessuto tumorale ruoli simili ai normali fibroblasti attivati durante i processi di guarigione delle ferite, pertanto il cancro è considerato una ferita che non guarisce (126). Ciò che li differenzia è che i fibroblasti normali diventano attivi in maniera transitoria, i CAF invece nel microambiente tumorale risultano persistenti.

Analisi di microarray e proteomica hanno rivelato che i CAF presentano profili d'espressione genica e proteica distinti rispetto ai fibroblasti normali isolati in seguito a mastoplastica riduttiva, mostrando alterazioni genetiche e/o epigenetiche (127-129). Coerentemente con ciò, i CAF presentano alcune modifiche cancro-specifiche, tra cui un'alterazione del signaling p53 p21-dipendente in risposta ai raggi  $\gamma$ , un aumento dei livelli di survivina, aumento della resistenza al cisplatino e ai raggi UV e una forte espressione dei marcatori di proliferazione Ki-67 e PCNA (130). Tuttavia, queste cellule non sono neoplastiche perché senescenti in coltura e sono impossibilitate a crescere in vivo negli xenotrapianti tumorali (131).

Esistono prove sostanziali del fatto che i CAF contribuiscono attivamente alla crescita tumorale mediante la formazione di un terreno fertile favorevole all'espansione delle cellule cancerose (132). Tali osservazioni sono state confermate a livello cellulare, in cui Shekhar e i suoi collaboratori, utilizzando un modello in vitro tridimensionale di interazione cellula-cellula, hanno dimostrato il ruolo mitogeno dei CAF sulle cellule epiteliali del seno, favorendo in tal modo la progressione tumorale (133). Questo effetto è stato rivelato anche in vivo quando la linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7, debolmente tumorigenica nei topi SCID, risultava altamente proliferante quando inoculata con fibroblasti attivi (134), accelerando così la crescita neoplastica e riducendo il periodo di latenza dei tumori umani nei topi (135). Altri studi che utilizzano modelli di xenotrapianto tumorale hanno dimostrato che i CAF accelerano la progressione tumorale e aumentano l'angiogenesi nel carcinoma mammario attraverso la mobilitazione e il reclutamento di cellule endoteliali (136, 137). Tutte queste osservazioni forniscono una chiara evidenza del ruolo attivo dei CAF nelle varie fasi della carcinogenesi mammaria.

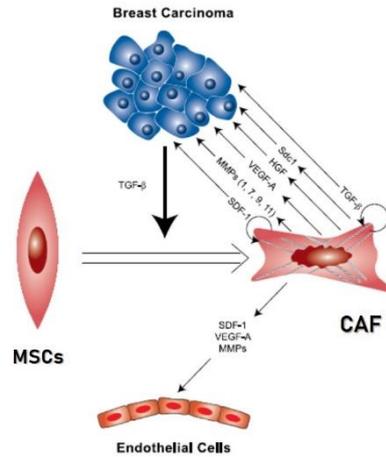
Durante lo sviluppo dei tumori al seno, le componenti epiteliali e stromali comunicano attraverso interazioni eterotipiche che non richiedono necessariamente il contatto cellula-cellula, ma possono essere influenzati reciprocamente da effettori solubili secreti. È stato infatti dimostrato, mediante analisi di microarray, che cellule di carcinoma mammario MDA-MB231 co-coltivate con i CAF in un sistema in transwell (che consente lo scambio di fattori diffusibili), , mostrano numerosi geni differenzialmente espressi rispetto alle MCF-10 coltivate con CAF e rispetto alle monoculture (138).

I CAF promuovono lo sviluppo neoplastico mediante la secrezione di molecole solubili come fattori pro-angiogenici, metallo-proteinasi (MMP), citochine, chemochine e fattori di crescita. SDF-1 (CXCL12) rappresenta una molecola ampiamente coinvolta nel crosstalk tra CAF e cellule tumorali, in quanto aumenta la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule cancerose (127), oltre che indurre un aumento dell'angiogenesi reclutando cellule progenitrici endoteliali nei carcinomi (137). I CAF promuovono anche la proliferazione delle cellule staminali CD44+CD24- nelle mammosfere, in maniera SDF-1-dipendente migliorando in vivo la tumorigenicità nei topi (139).

Si ritiene che i fibroblasti associati al carcinoma mammario abbiano tre importanti origini distinte:

- a) *dalla trasformazione all'interno del tumore dei fibroblasti stromali normali.* È stata osservata la conversione di fibroblasti normali residenti in CAF nel corso della progressione del tumore in un modello di xenotrapianto di tumore mammario e si ritiene che tale trasformazione sia influenzata dall'impatto paracrino del carcinoma; uno studio infatti dimostra che il TGF- $\beta$  (il cui rilascio da parte delle cellule cancerose è ampiamente noto) può indurre la produzione di  $\alpha$ -SMA nei fibroblasti mammari in vitro e indurre la loro trasformazione in CAF (140).

- b) *dalla trans-differenziazione di diversi tipi di cellule presenti nel seno come cellule epiteliali, endoteliali, adipociti e periciti.* Alcuni studi dimostrano che la transizione epiteliale mesenchimale (EMT), meccanismo importante della progressione neoplastica, possa dare origine a CAF con una maggiore capacità migratoria, invasività e una maggiore espressione di proteine della matrice extracellulare (124, 141). Allo stesso modo, anche la transizione endoteliale a mesenchimale (EndMT), caratterizzata dalla perdita di marcatori endoteliali come CD31, e acquisizione di marcatori mesenchimali come  $\alpha$ -SMA è in grado di generare CAF (142, 143). È interessante notare che sia le transizioni EMT che EndMT possono avvenire dopo l'esposizione al TGF- $\beta$  (144,145), suggerendo quindi il peculiare ruolo del tumore nell'origine dei CAF.
- c) *dalla trans-differenziazione delle MSC.* È noto che le MSC migrano verso siti tumorali (146, 147) e possono trans-differenziare in CAF esprimendo elevati livelli di  $\alpha$ -SMA e mostrando caratteristiche fenotipiche fibroblastoidi (148, 149). È stato dimostrato che, la presenza di acido lisofosfatidico (LPA) induce l'espressione di  $\alpha$ -SMA e SDF-1 nelle MSC, stimolando la loro trasformazione in CAF (150). Inoltre proprio come i CAF, le MSC attivate dall'esposizione prolungata dei mezzi condizionati dalle cellule tumorali, esprimono alti livelli di SDF-1, un segno distintivo dei fibroblasti tumorali e di induzione alla progressione neoplastica (149). Questi studi suggeriscono fortemente che le MSC costituiscono una fonte importante di CAF nei carcinomi alla mammella (Figura 9).



**Figura 9: I CAF promuovono la crescita del cancro e l'angiogenesi attraverso fattori secreti.** (modificato da 150)

L'interazione funzionale esistente tra le cellule epiteliali e microambiente tumorale suppone che i CAF possano costituire un prezioso marcatore prognostico e predittivo per i pazienti con tumore al seno. In effetti, numerosi studi hanno osservato una correlazione tra l'espressione genica di marcatori di CAF mammari e l'outcome di tumori alla mammella (151), oltre che un'associazione con la resistenza a chemioterapia neoadiuvante con 5-fluorouracile, epirubicina e ciclofosfamide (152). È stato dimostrato che lo stato della proteina soppressoria del tumore p53, presente nei CAF, può essere un marker predittivo per i carcinomi mammari invasivi, in quanto evidenze scientifiche dimostrano che la sua espressione nei fibroblasti tumorali, ma non nelle cellule cancerose, è associata al numero di metastasi nodali in pazienti con carcinoma duttale invasivo (153). Inoltre, un'analisi multivariata ha dimostrato che anche l'espressione di SDF-1 possa rappresentare un fattore correlato alla sopravvivenza di pazienti con carcinomi mammari ER-positivi. Pertanto SDF-1 prodotto dai CAF potrebbe avere un significativo valore prognostico ed essere clinicamente utile per l'individuazione di una terapia adiuvante in pazienti con tumori al seno ER-positivi (154). È stato anche dimostrato che l'espressione dell'altro importante marcatore di CAF,  $\alpha$ -SMA, è correlata ad una maggiore crescita e invasività tumorale oltre che ad una prognosi clinica sfavorevole (155).

Queste evidenze forniscono prove chiare del fatto che, nel prossimo futuro, i CAF stromali possano essere di grande valore per la diagnostica e prognostica dei tumori al seno al fine dello sviluppo di nuovi trattamenti individualizzati che terranno conto dello stato e degli effetti del microambiente tumorale.

## CAPITOLO 2

### SCOPO DELLA TESI

Diabete e cancro sono patologie epidemiologicamente e statisticamente correlate (20). In particolare, pazienti affetti da diabete di tipo 2 mostrano un aumento del rischio di carcinoma mammario del 20% (33) ed un aumento del rischio di mortalità ad esso associata del 50%.

La ricerca scientifica dimostra che la progressione del tumore oltre a svilupparsi in seguito a cambiamenti epigenetici e genetici può dipendere anche dalla comunicazione tra cellule tumorali e cellule stromali circostanti che costituiscono il microambiente tumorale (72), il quale rappresenta un importante promotore dello sviluppo neoplastico in particolar modo nel tumore alla mammella (73,74).

Il tessuto adiposo, rappresenta una componente importante del microambiente tumorale, soprattutto nel carcinoma mammario (46) e interviene attivamente nell'associazione tra diabete e cancro (72, 78). Esso risponde infatti alle alterazioni metaboliche, che si verificano nel diabete e nell'obesità rilasciando una varietà di molecole in grado di promuovere la proliferazione, la migrazione, l'invasività e la resistenza ai farmaci di cellule di carcinoma mammario (84-86).

Oltre agli adipociti, il tessuto adiposo comprende numerosi tipi cellulari, tra cui cellule mesenchimali staminali (MSC), le quali in seguito a stimoli metabolici, infiammatori e tumorali possono rilasciare molecole che favoriscono la progressione neoplastica (118). Nel microambiente tumorale sono anche presenti i cosiddetti Fibroblasti Associati al Cancro (CAF). La loro origine può dipendere da una trans-differenziazione delle MSC che, influenzate dal tumore, perdono proprietà specifiche delle cellule staminali acquisendo caratteristiche fibroblastoidi e contribuiscono attivamente alla crescita tumorale (132).

Si instaura dunque una vera e propria comunicazione bidirezionale tra cellule tumorali e componente stromale del microambiente e in questa interazione il tumore può modificare il suo microambiente e quest'ultimo può influire sulle modalità con cui un tumore stesso cresce e si diffonde.

Se da un lato l'impatto delle alterazioni metaboliche come l'iperglicemia (principale alterazione associata al diabete) sulle cellule cancerose e sul microambiente stromale è ampiamente dimostrato, al contrario il suo effetto sull'interazione tumore-stroma risulta quasi inesplorato. Ed è verosimile che l'iperglicemia, influenzando sia le cellule cancerose che il microambiente tumorale, possa interferire con il cross-talk cellulare e sostenere così lo sviluppo neoplastico.

A tal proposito, lo scopo di questo lavoro di dottorato è comprendere l'impatto del glucosio sull'interazione tra cellule di carcinoma mammario e MSC isolate da tessuto adiposo e valutare il suo effetto nella comunicazione tumore-stroma, al fine di comprendere il suo ruolo nella progressione e aggressività tumorale.

## CAPITOLO 3

### RISULTATI

#### 3.1 Caratteristiche delle pazienti sottoposte a mastoplastica riduttiva

Biopsie di tessuto adiposo mammario utilizzate per isolare le cellule mesenchimali staminali, sono state ottenute da 38 pazienti sottoposte a mastoplastica riduttiva, le quali non presentavano al momento dell'intervento nessuna patologia infiammatoria acuta, endocrino-metabolica o neoplastica.

Come mostrato dalla Tabella 1, l'età media delle pazienti è  $40,3 \pm 13,9$  anni, la media del peso corporeo espresso in Kg è  $75,1 \pm 12,9$ ; quella dell'altezza espressa in metri è  $1,6 \pm 0,1$  mentre la media dell'indice di massa corporea (BMI) è  $28,3 \pm 5$ .

In seguito agli esami biochimici plasmatici eseguiti prima dell'intervento chirurgico risulta che la media dei livelli di glicemia, colesterolemia e trigliceridemia espressi in mg/dl sono rispettivamente  $86,8 \pm 17,1$ ,  $191,3 \pm 29,2$  and  $90,1 \pm 36,9$ .

PARAMETERS	PATIENTS (N=38)
Age	$40,3 \pm 13,9$
Wheight (kg)	$75,1 \pm 12,9$
Height (m)	$1,6 \pm 0,1$
BMI	$28,3 \pm 4,9$
Glycaemia (mg/dl)	$86,8 \pm 17,1$
Cholesterolemia (mg/dl)	$192,1 \pm 28,7$
Triglyceridemia (mg/dl)	$90,1 \pm 37,3$

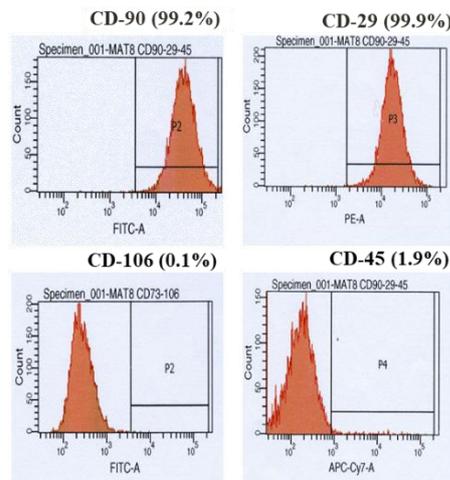
*Tabella1. Caratteristiche delle pazienti. I dati sono mostrati come valori della media  $\pm$  la deviazione standard*

### **3.2 Caratterizzazione delle Ad-MSC isolate da biopsie di tessuto adiposo mammario**

Le biopsie di tessuto adiposo sono state utilizzate per ottenere la frazione vasculostromale da cui sono state isolate le cellule mesenchimali staminali mediante uno specifico protocollo come descritto in Materiali e Metodi. Le cellule sono state tenute in piastra grazie alla loro capacità di attecchire e moltiplicarsi in aderenza, una proprietà che le differenzia dagli altri tipi cellulari contenuti nella frazione vasculostromale (cellule endoteliali, fibroblasti, cellule immunitarie, cellule muscolari). Per validare la natura staminale di tali cellule esse sono state caratterizzate in base a caratteristiche immunofenotipiche e alla capacità differenziativa.

#### **a) Immunofenotipo**

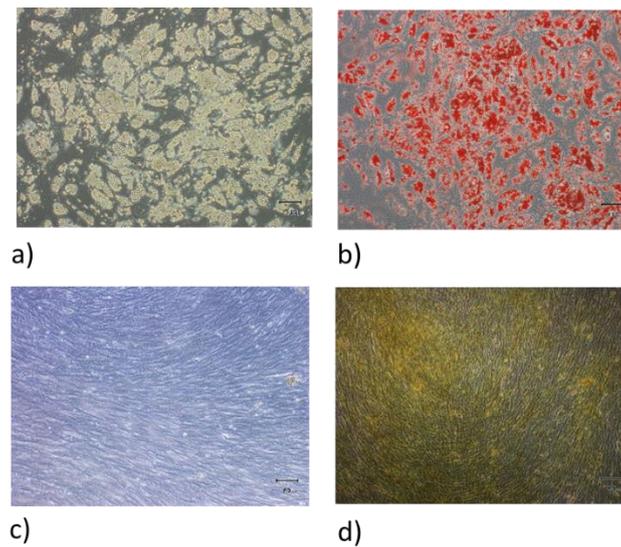
Le Ad-MSC sono caratterizzate dalla presenza di specifici marcatori cellulari definiti clusters di differenziazione (CD). Mediante un'analisi citofluorimetrica è stata valutata l'espressione degli antigeni di superficie CD90, CD29, CD106 e CD45. Come mostrato dalla figura 10, le cellule mostrano una positività per CD90 e CD29 (99,2% e 99,9% rispettivamente) e un'espressione negativa di CD106 e CD45. Questa caratterizzazione conferma la natura staminale delle cellule isolate dal tessuto adiposo in quanto risultano fortemente positive per i marcatori di cellule mesenchimali staminali e negative per marcatori specifici di cellule endoteliali e cellule immunitarie (CD106 e CD45 rispettivamente).



**Figura 10. Immunofenotipo delle Ad-MSC.** Analisi citofluorimetrica per l'identificazione di specifici marcatori di superficie ( $CD\ 90^+$ ,  $CD29^+$ ,  $CD106^-$ ,  $CD45^-$ ).

#### b) Differenziamento adipocitario e osteogenico

Una peculiarità della cellula mesenchimale staminale è la sua potenzialità a differenziare in altri tipi cellulari. A tal scopo le Ad-MSC isolate da tessuto adiposo mammario sono state stimulate con specifiche mix di differenziamento mediante un preciso protocollo, come descritto in Materiali e Metodi. È stata quindi valutata la loro capacità differenziativa verso la linea adipocitaria e osteogenica mediante colorazione Oil-Red-O e Alizarin-Red rispettivamente. Come mostrato dalle immagini, le Ad-MSC sono in grado di accumulare sia depositi di lipidi che di calcio (Figura 11) a seconda dello stimolo differenziativo indotto, confermando che dall'isolamento si è ottenuto un pool di cellule che corrisponde esattamente alle cellule mesenchimali staminali.



**Figura 11. Differenziamento adipocitario ed osteogenico.** a) Ad-MSC differenziate in adipociti; b) colorazione Oil-Red-O, c) Ad-MSC differenziate in osteoblasti; d) colorazione Alizarin red

### 3.3 Effetto del glucosio sull'interazione tra cellule di carcinoma mammario e cellule mesenchimali staminali

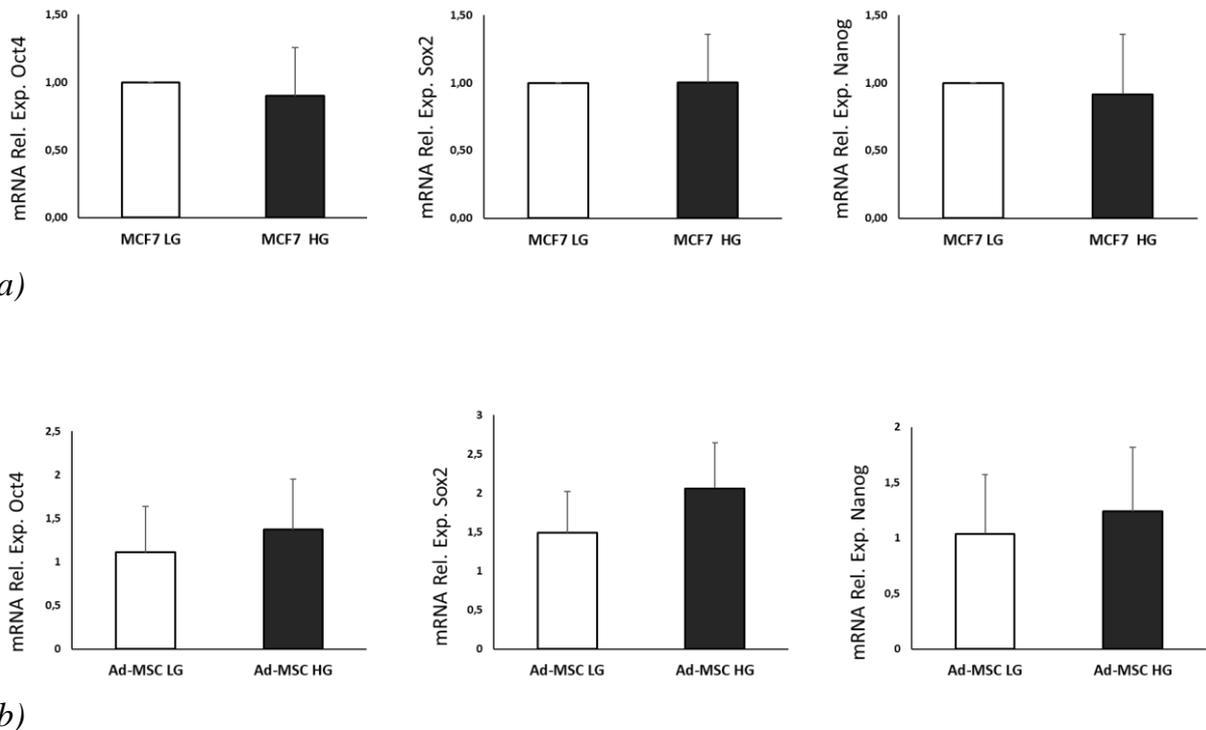
Per studiare il ruolo del glucosio nell'interazione tra carcinoma mammario e microambiente adiposo, sono state allestite colture in 2D. Tale metodica prevede l'utilizzo di inserti posizionati in piastre multi-pozzetto dotati di una membrana la cui porosità impedisce l'attraversamento delle cellule su di essa piastrate, ma favorisce il passaggio dei prodotti secreti. Si ottiene pertanto un sistema che permette lo scambio di metaboliti tra le cellule di carcinoma mammario MCF7 e le cellule mesenchimali staminali (Ad-MSC) influenzandosi così reciprocamente. In questo sistema di co-culture le cellule MCF7 sono state piastrate all'interno dell'inserto poroso, mentre le Ad-MSC all'interno della piastra multi-pozzetto e sono state tenute in alte o basse concentrazioni di glucosio (25 mM; HG, high glucose o 5,5mM; LG, low glucose) per mimare rispettivamente una condizione di iperglicemia e normoglicemia nell'uomo. Dopo tre giorni di coltura è stata valutata la multipotenza delle Ad-MSC, essendo essa una caratteristica peculiare e indispensabile per assicurare il corretto rinnovamento tissutale, e la staminalità delle cellule cancerose la cui alterazione

fornisce informazioni sull'aggressività tumorale in quanto indice di farmaco-resistenza. A tal fine sono stati misurati i livelli di espressione genica di tre marcatori di staminalità e “master regulators” della multipotenza, Oct4, Sox2, Nanog in entrambi i tipi cellulari mediante qReal-Time PCR.

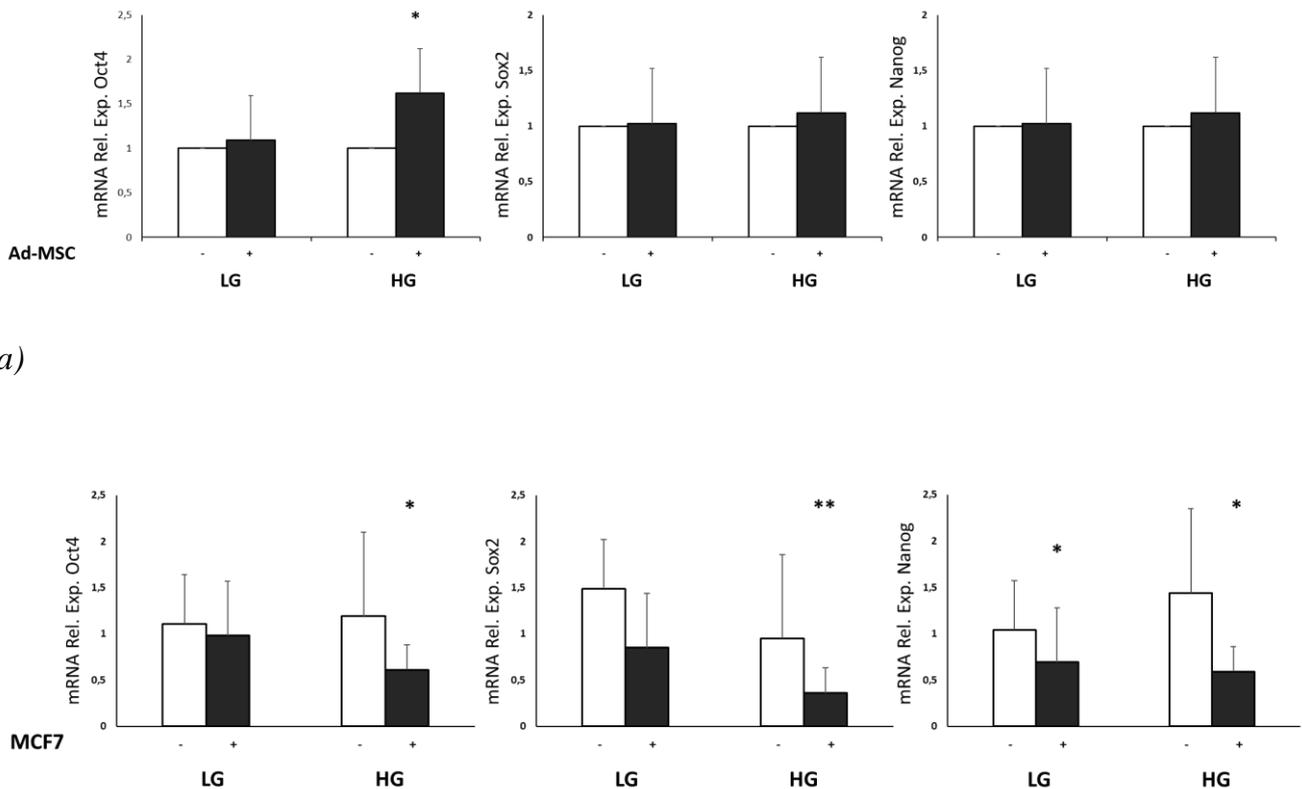
In primo luogo è stato esaminato l'effetto del glucosio sull'espressione genica dei tre geni in esame e come mostrato dai grafici, sia le cellule tumorali MCF7 che le Ad-MSc non subiscono variazioni dei trascritti quando poste in alte concentrazioni di glucosio rispetto alla condizione di normo-glicemia (Figura 12).

In seguito, è stato valutato l'impatto di ciascun tipo cellulare sull'altro e il ruolo del glucosio in tale interazione. I risultati ottenuti mostrano che in basse concentrazioni di glucosio, le cellule MCF7 non subiscono variazioni dell'espressione genica in presenza delle Ad-MSc; quest'ultime invece quando co-coltivate con le cellule MCF7 mostrano una riduzione significativa dei livelli d'espressione di Nanog di 1,5 volte rispetto alle Ad-MSc in monocultura. Contrariamente a ciò, quando il sistema in 2D è posto in alte concentrazioni di glucosio, si osserva nelle cellule MCF7 un aumento significativo dei livelli di espressione di Oct4 di 1,6 volte rispetto al proprio controllo in monocultura, mentre l'espressione dei geni Sox2 e Nanog resta inalterata. Diversamente, le Ad-MSc co-coltivate con le MCF7 mostrano una riduzione significativa di Oct4, Sox2 e Nanog di 2, 2,7 e 2,5 volte rispettivamente rispetto alle stesse cellule in monocultura poste in HG (Figura 13).

Riassumendo, questi risultati suggeriscono che il glucosio non altera la staminalità delle cellule MCF7 né la multipotenza delle Ad-MSc, ma la presenza delle cellule tumorali anche in basse concentrazioni di glucosio induce un lieve cambiamento fenotipico delle cellule stromali mediante la riduzione dei livelli d'espressione di Nanog. L'informazione più interessante è che in qualche modo il glucosio influenza il cross-talk tra cellule tumorali e microambiente adiposo, inducendo verosimilmente cambiamenti fenotipici in entrambi i tipi cellulari, più specificamente portando ad una possibile acquisizione di staminalità delle cellule di carcinoma mammario MCF7 (aumento dei livelli d'espressione genica di Oct4) e al contempo una perdita di multipotenza delle cellule mesenchimali staminali (riduzione dei livelli d'espressione di Oct4, Sox2 e Nanog).



**Figura 12.** Effetto del glucosio sulla staminalità e multipotenza della MCF7 e Ad-MSC rispettivamente. Le MCF7 (a) e le Ad-MSC (b) sono state poste in LG e HG. Dopo 3 giorni sono stati analizzati i livelli di espressione genica di Oct4, Sox2, Nanog mediante qReal-Time PCR. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al gene housekeeping (ciclofilina). Ciascun valore è relativo ai valori ottenuti dal campione di riferimento MCF7 LG/Ad-MSC LG.



b)

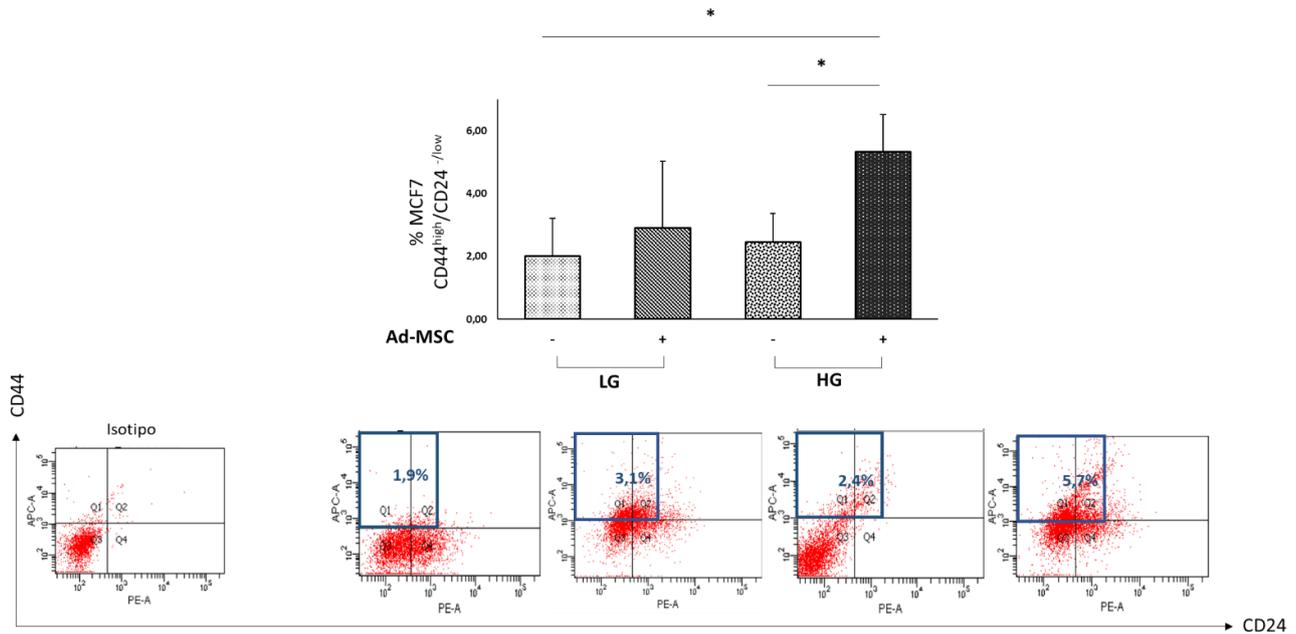
**Figura 13. Impatto delle MCF7 sulla multipotenza delle Ad-MSC ed effetto delle Ad-MSC sulla staminalità delle MCF7 in diverse concentrazioni di glucosio.** Le MCF7 e Ad-MSC sono state co-coltivate in LG o HG. Dopo 3 giorni è stata valutata l'espressione dei geni Oct4, Sox2 e Nanog mediante qReal time PCR. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al gene housekeeping (ciclofilina). Ciascun valore è relativo ai valori ottenuti dal campione di riferimento MCF7 LG/MCF7 HG (a) e Ad-MSC LG/Ad-MSC HG (b). \*  $p_{value} < 0,05$  e \*\*  $p_{value} \leq 0,01$  indica la significatività statistica.

### 3.4 Impatto del glucosio e delle Ad-MSC sulla staminalità delle cellule tumorali

I risultati mostrati nel Paragrafo 3.3 suggeriscono una possibile acquisizione di staminalità delle MCF7 quando co-coltivate con le cellule mesenchimali staminali in presenza di alte concentrazioni di glucosio. Per confermare tale cambiamento fenotipico è stata esaminata la presenza delle cosiddette “Cancer Stem Cells” (CSC), all’interno della popolazione tumorale; tale sottopopolazione è caratterizzata dalla presenza di specifici marcatori di superficie  $CD44^{high}/CD24^{-/low}$ . Mediante il medesimo approccio delle colture in 2D, le cellule MCF7 e le Ad-MSC sono state poste in LG o HG e dopo 3 giorni le cellule tumorali sono state raccolte e sottoposte ad analisi citofluorimetrica per valutare la quota di CSC.

Come mostrato dalla figura 14, le cellule MCF7 non manifestano variazioni fenotipiche né se poste in alte concentrazioni di glucosio né in presenza delle cellule stromali in LG. Al contrario si osserva un arricchimento della sottopopolazione con proprietà staminali (CSC) quando le cellule tumorali sono co-coltivate con le Ad-MSC in alte concentrazioni di glucosio; si verifica infatti un aumento statisticamente significativo della percentuale di popolazione  $CD44^{high}/CD24^{-/low}$  di 2,7 e 2,2 volte rispetto alle cellule MCF7 in LG e HG rispettivamente.

Questo risultato supporta l’ipotesi che le cellule di carcinoma mammario MCF7 co-coltivate con le Ad-MSC subiscano un potenziale cambiamento fenotipico indotto dal glucosio, portando all’acquisizione di caratteristiche simil-staminali e rendendole pertanto più aggressive.

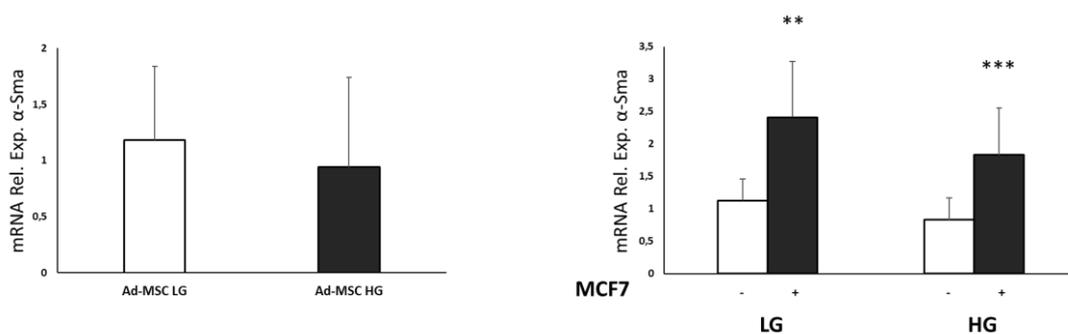


**Figura 14. Impatto del glucosio e delle Ad-MSC sulle CSC.** Le MCF7 sono state poste in LG o HG in presenza o in assenza delle Ad-MSC (sistema di colture 2D) e dopo 3 giorni è stata valutata mediante FACS la percentuale di cellule MCF7 - CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-low</sup> (CSC). Il grafico a barre è una rappresentazione delle percentuali di CSC mostrate nel pannello inferiore (quadrante evidenziato in blu). \*  $p_{value} < 0,05$  indica la significatività statistica.

### 3.5 Impatto del glucosio e delle MCF7 sulla transdifferenziazione delle Ad-MSC

I risultati mostrati nel Paragrafo 3.3, indicano che la presenza delle cellule di carcinoma mammario MCF7 causi una piccola perdita di multipotenza delle Ad-MSC (riduzione dei livelli di espressione di Nanog) quando sono tenute in basse concentrazioni di glucosio, ma tale riduzione diventa considerevole se il sistema 2D è posto in alte concentrazioni di glucosio (riduzione dei livelli d'espressione di Oct4, Sox2 e Nanog). Per comprendere meglio le alterazioni fenotipiche subite dalle cellule stromali è stata esaminata la possibilità che esse potessero aver acquisito caratteristiche fibrotiche e che quindi potessero transdifferenziare in “Fibroblasti Associati al Cancro” (CAF). Al tal fine, le Ad-MSC tenute per 3 giorni in LG o HG con o senza le cellule MCF7, sono state raccolte per valutare l'espressione di un

marcatore selettivo di fibrosi,  $\alpha$ -Sma (alpha smooth muscle actin) nonché indicativo di CAF mediante qReal-Time PCR. Come mostrato dal grafico in Figura 15, il glucosio non modifica l'espressione del gene in questione ma la presenza delle cellule tumorali, indipendentemente dalle concentrazioni di glucosio, induce un aumento dei livelli d'espressione genica di  $\alpha$ -Sma. Più specificamente si osserva un incremento statisticamente significativo di 2,1 e 2,2 volte rispettivamente in LG e HG, rispetto ai propri controlli in monocultura.



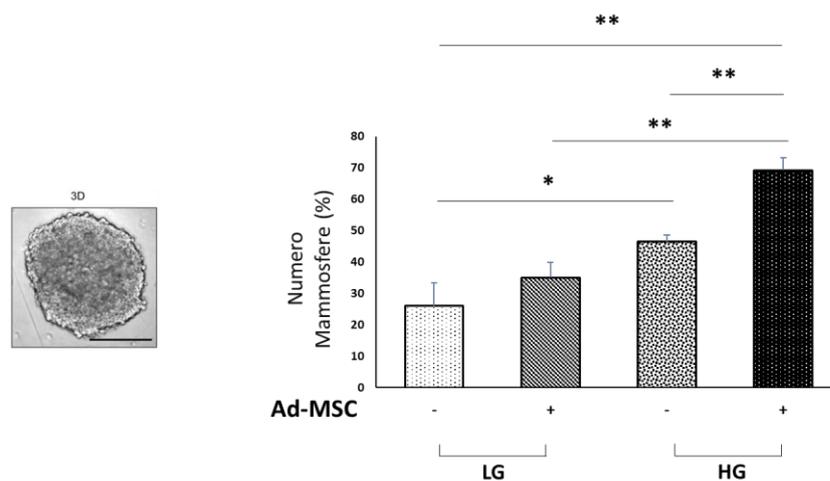
**Figura 15. Impatto delle MCF7 sulla trans-differenziazione delle Ad-MSC in CAF.** Le Ad-MSC sono state tenute in LG o HG in presenza o assenza delle MCF7 (sistema di colture 2D). Dopo 3 giorni è stata valutato il livello d'espressione del gene  $\alpha$ -Sma mediante qReal time PCR. I valori d'espressione sono normalizzati rispetto al gene housekeeping (ciclofilina). \*\*  $p_{value} \leq 0,01$  e \*\*\*  $p_{value} \leq 0,001$  indica la significatività statistica.

### 3.6 Ruolo del glucosio e delle Ad-MSC nella formazione delle Mammosfere

Per avvalorare l'ipotesi dell'acquisizione di un fenotipo "staminale" da parte delle cellule di carcinoma mammario MCF7 quando co-coltivate con le cellule stromali adipose in un ambiente iper-glucidico, è stata valutata la capacità delle cellule tumorali di crescere in maniera ancoraggio-indipendente e formare strutture tridimensionali di forma sferica definite "mammosfere". Le cellule MCF7 sono state poste in piastre multi-pozzetto con e senza le Ad-MSC in una quantità cellulare numericamente bassa essendo questo un requisito fondamentale per confermare la natura staminale di una cellula tumorale (4 cellule MCF7 e 1 Ad-MSC). Dopo 10

giorni di coltura (tempo necessario per apprezzare la formazione delle mammosfere) in LG o HG è stata valutata la capacità di aggregazione in maniera ancoraggio indipendente osservando il numero di mammosfere formatesi in ogni condizione sperimentale.

Come si osserva dal grafico (Figura 16), le cellule MCF7 mostrano caratteristiche staminale maggiori quando poste in alte concentrazioni di glucosio; la percentuale del numero di mammosfere risulta infatti più elevata in maniera statisticamente significativa di 1,8 volte rispetto a quella formata in LG. Diversamente, le Ad-MS non modificano la capacità delle cellule tumorali di crescere in superficie, ma se il sistema di coltura in 3D è tenuto in HG, le cellule mesenchimali staminali sembrano potenziare l'effetto del glucosio, aumentando infatti la capacità delle cellule tumorali di generare un maggior numero di mammosfere. Si verifica pertanto un incremento statisticamente significativo della percentuale di mammosfere di 2,5 volte rispetto al numero generatosi in HG e di 2,7 volte rispetto a quello ottenuto dalle sole MCF7 in LG.



**Figura 16. Impatto del glucosio e delle Ad-MS sulla formazione di mammosfere.** Le MCF7 sono state coltivate in piastre multi-pozzetto con e senza le Ad-MS in LG o HG. Dopo 10 giorni è stata valutata la capacità di formare mammosfere. A sinistra vi è la raffigurazione della mammosfera osservata al microscopio. A destra è mostrata la percentuale di mammosfere formatesi in ogni condizione sperimentale. \*  $p_{value} < 0,05$ , \*\*  $p_{value} \leq 0,01$  e \*\*\*  $p_{value} \leq 0,001$  indica la significatività statistica.

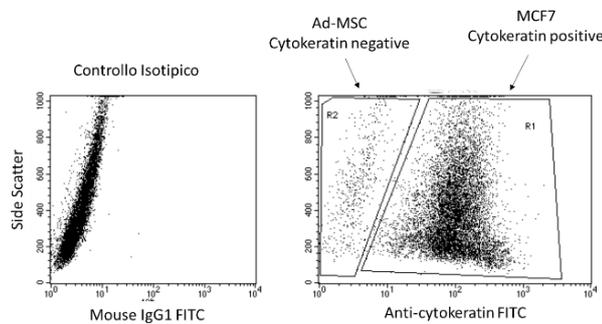
### 3.7 Il glucosio modifica il cross-talk tra tumore-stroma nelle colture in 3D

Il sistema delle colture 3D è un approccio sperimentale in vitro capace di mimare, non solo le interazioni intercellulari, ma anche le condizioni chimico-fisiche presenti nei tumori in vivo. Pertanto, al fine di valutare il ruolo del glucosio nell'interazione tumore-stroma è stato utilizzato anche l'approccio delle colture tridimensionali in quanto più fisiologico e all'avanguardia. In tale sistema, le cellule di carcinoma mammario MCF7 sono state poste in piastre "ultra-low-attachment" (ULA) per impedire l'adesione alla loro superficie, con o senza le cellule mesenchimali staminali e tenute in basse e alte concentrazioni di glucosio. Dopo 3 giorni è stata verificata l'avvenuta formazione delle mammosfere e in seguito ad un'accurata disgregazione meccanica, sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per valutare da un lato, l'espressione proteica di Oct4 nelle cellule tumorali MCF7 e dall'altra l'espressione  $\alpha$ -Sma nelle Ad-MSc. Dopo la disgregazione, le due diverse popolazioni cellulari costituenti la mammosfera sono state discriminate mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-citocheratina, marcatore specifico di cellule epiteliali ottenendo così la separazione delle MCF7 (citocheratina-positive) dalle Ad-MSc (citocheratina-negative) (Figura 17a).

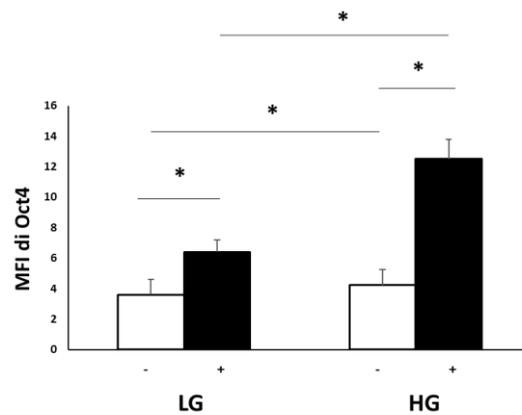
Come mostrato nella Figura 17b, l'HG induce nelle cellule MCF7 un lieve ma significativo incremento della quantità proteica di Oct4 di 1,2 volte rispetto alle cellule tumorali tenute in LG. Quando le cellule tumorali interagiscono con le cellule stromali mostrano un incremento maggiore dei livelli proteici di Oct4 di 1,8 volte rispetto alle cellule MCF7 in LG. A conferma dei risultati precedentemente mostrati, le cellule MCF7 risultano maggiormente indotti verso la staminalità quando interagiscono con le cellule mesenchimali staminali in un ambiente iper-glucidico; si osserva infatti un aumento statisticamente significativo dei livelli proteici di Oct4 di 3 volte rispetto alle cellule MCF7 da sole in HG e di 2 volte rispetto alle cellule tumorali co-coltivate con le Ad-MSc in LG.

Per quanto riguarda le Ad-MSc, l'analisi citofluorimetria rivela che il glucosio non modifica l'espressione proteica di  $\alpha$ -Sma. Quando entrano invece in contatto con le cellule tumorale MCF7 in LG si verifica un lieve ma significativo aumento di circa 1,2 volte rispetto alle cellule stromali da sole in LG. Al contrario, quando la

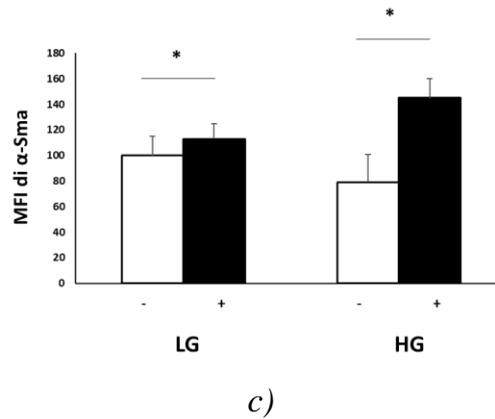
mammosfera è posta in HG, l'incremento di  $\alpha$ -Sma è considerevole, aumenta infatti in maniera statisticamente significativa di 1,8 volte rispetto alle sole Ad-MSK in HG. (Figura 17c). Anche questo risultato conferma l'assunto che il glucosio sia in grado di modificare l'interazione tumore-stroma adiposo inducendo cambiamenti fenotipici delle Ad-MSK, le quali in presenza delle cellule tumorali tenderebbero a transdifferenziare in CAF cosicché possano sostenere il fenotipo canceroso rendendolo finanche più staminale e quindi potenzialmente più aggressivo.



a)



b)



**Figura 17. Espressione proteica di Oct4 e  $\alpha$ -Sma nelle cellule MCF7 e Ad-MSC rispettivamente (colture 3D) mediante FACS.** Le cellule tumorali MCF7 e le Ad-MSC sono state tenute in piastre ULA per favorire la formazione di mammosfere. Dopo 3 giorni di coltura in LG o HG le mammosfere sono state disgregate meccanicamente e le 2 popolazioni cellulari sono state discriminate con l'anticorpo anti-citocheratina (a) per valutare i livelli di espressione proteica di Oct4 nelle MCF7 e di  $\alpha$ -Sma nelle Ad-MSC in termini di Intensità Media di Fluorescenza (MFI) mediante analisi citofluorimetrica. \*  $p_{value} < 0,05$  indica la significatività statistica.

## CAPITOLO 4

### MATERIALI E METODI

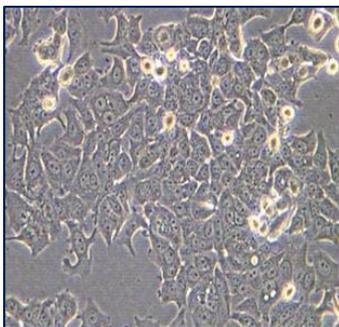
#### 4.1 Isolamento cellule mesenchimali staminali

Le cellule della frazione vasculo-stromale (SVF) sono state isolate da biopsie di tessuto adiposo mammario di 38 donne sottoposte a mastoplastica riduttiva. I tessuti sono stati processati sotto una cappa a flusso laminare. Dopo aver eliminato i residui di sangue mediante lavaggi con terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) F12(1:1) 10% siero fetale bovino (FBS), 2 mM L-Glutamina, Pennicillina 100 (U/ml), Streptomicina (50 µg/ml) ed Amfotericina B (1.5 µg/ml), il tessuto è stato processato meccanicamente mediante l'uso di forbici sterili fino ad ottenere piccoli frammenti a cui è stata aggiunta la Collagenasi (1 mg/ml). La digestione enzimatica è stata condotta per 45 minuti in agitazione a 37° C. Il tessuto così digerito è stato filtrato con filtri da 250 µm. Dopo circa 10min si è ottenuta una separazione di fasi, una fase superiore gialla più densa e una inferiore più liquida. Dalla prima è stato possibile isolare adipociti maturi e dalla seconda, cellule della frazione vasculo-stromale (SVF) contenenti le MSC. Le cellule SVF sono state centrifugate per 5 minuti a 1300 rpm. Dopo aver eliminato il sovrantante, il pellet è stato risospeso in DMEM-F12 10% FBS e piastrato in flask da 25 cm<sup>2</sup>.

#### 4.2 Colture cellulari

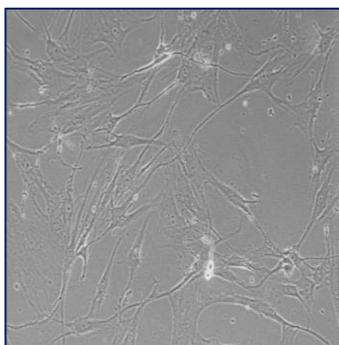
Le cellule di carcinoma mammario MCF-7 sono state isolate nel 1970 da un tumore alla mammella di una donna americana Caucasica di 69 anni. MCF-7 è l'acronimo del Michigan Cancer Foundation -7, istituto di Detroit (USA) dove la linea cellulare è stata coltivata e linearizzata nel 1973 da Herbert Soule e dai suoi collaboratori (156). Tali cellule originano da effusione pleurale, sono positive per i recettori degli estrogeni e i recettori progestinici (157,158) (Figura 18).

Le MCF-7 sono state coltivate in piastre da 100 mm di diametro, utilizzando il terreno di coltura DMEM FBS (GIBCO), 2 mM L-Glutammina (SIGMA), penicillina (100 U/ml), streptomicina (50 µg/ml) ed amfotericina B (1.5 µg/ml) (SIGMA) e contenente una concentrazione di glucosio pari a 5.5mM (Low glucose; LG).



**Figura 18:** Immagine al microscopio della linea di adenocarcinoma mammario MCF7

Sia le MCF-7 che le SVF sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 95% di aria ed il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule giunte alla confluenza richiesta sono state staccate dalla piastra alla quale aderivano tramite l'uso di una soluzione di Tripsina (0.3%), Glucosio (0.1%) ed EGTA (2 mM) disciolta in PBS pH 7.3 (13.7 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O), centrifugate in tubi da 15 ml per 5' a 1300 rpm ed infine risospese in terreno fresco di coltura e piastrate alla concentrazione desiderata. Dopo 4 passaggi in coltura, le MSC sono state caratterizzate la valutazione del potenziale differenziativo (Paragrafo 4.3) e mediante analisi citofluorimetrica (Paragrafo 4.6).



**Figura 19:** Immagine al microscopio di cellule mesenchimali staminali isolate da biopsie di tessuto adiposo mammario

### 4.3 Differenziamento adipocitario e osteogenico

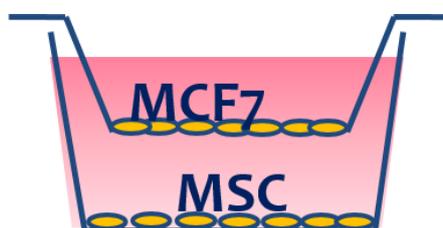
- **Differenziamento adipocitario.** Le MSC sono state piastrate in multiwell da 24 pozzetti in numero di  $6 \times 10^5$  cellule per pozzetto. Le cellule sono state mantenute in coltura in DMEM-F12 (1:1) 10% FBS fino alla confluenza del 100%. Il giorno seguente, alle cellule è stato aggiunto una mix di differenziamento composta da: DMEM F12 3% FBS con aggiunta di Insulina 850 nM, Pantotenato 17  $\mu$ M, Biotina 33  $\mu$ M, IBMX (3-isobutil-1-metilxantine) 0,5 mM, Desametasone 10  $\mu$ M e Rosiglitazone 1  $\mu$ M. Dopo due giorni il mezzo di coltura è stato sostituito con il mezzo di mantenimento (DMEM F12 1:1 10% FBS) con aggiunta di Insulina 850 nM e Rosiglitazone 1  $\mu$ M. In seguito, ogni due giorni è stato fornito alle cellule terreno di coltura sempre fresco fino al completo differenziamento adipocitario. Dopo circa 14 giorni è stato valutato l'accumulo di lipidi intracellulari mediante colorazione Oil Red-O. Il colorante Oil-Red-O è in grado di legare i lipidi neutri contenuti nelle vescicole grasse degli adipociti maturi e di evidenziarli in rosso. Dopo aver eliminato il mezzo di coltura, gli adipociti sono stati lavati due volte con PBS 1X. Successivamente, le cellule sono state fissate con formaldeide 4%, ed incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo due lavaggi con PBS 1X le piastre sono state lavate rapidamente con alcool isopropilico 60% e poi incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con il colorante OilRed-O. Le cellule sono state nuovamente lavate 2 volte con PBS 1X per rimuovere il colorante non incorporato ed osservate al microscopio ottico.
- **Differenziamento osteogenico:** Le cellule sono state piastrate in multiwell da 24 pozzetti in numero di  $6 \times 10^5$  cellule per pozzetto in DMEM-F12 (1:1) 10% FBS fino alla confluenza del 100%. Il giorno seguente, alle cellule è stato aggiunto una mix di differenziamento composta da: 0,1  $\mu$ M di Desametasone, 10 mM di  $\beta$ -Glicerofosfato, 0,05mM di L-Acido Ascorbico, 0,05 mM di CaCl<sub>2</sub>, supplementata con FBS 10%, le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni, cambiando la mix ogni 2-3 giorni. Dopo 21 giorni è stato valutato l'accumulo di calcio intracellulare mediante colorazione specifica con Alizarin Red S (ARS) L'ARS, un derivato di un antrachinone, è un

intercalante in grado di legare granuli di calcio. Dopo 21 giorni di differenziamento, le cellule sono state lavate con PBS 1X, fissate con il 4% di paraformaldeide per 20 minuti e successivamente lavate con acqua bidistillata (bdH<sub>2</sub>O) e colorate con 500µl di Alizarin Red S Work Solution 40mM a pH 4,1. Dopo 15 minuti di incubazione al buio, su agitatore a temperatura ambiente, il colorante non incorporato è stato rimosso lavando con bdH<sub>2</sub>O. I depositi di calcio colorati in rosso sono stati visualizzati mediante microscopio ottico (159).

#### 4.4 Colture 2D

Le co-colture in 2D sono state preparate utilizzando un sistema in transwell costituito da Permeable Supports ovvero canestrini alloggiati all'interno di una piastra da 6 pozzetti per colture cellulari. Il canestrino presenta alla base una membrana di Polietilene tereftalato (PET) con pori delle dimensioni di 0.4 µm (Figura 20).

Al tempo  $t=0$ , le MSC ( $2 \times 10^4$  cells/well) sono state piastrate nella parte inferiore del sistema, mentre il giorno successivo le cellule MCF-7 ( $3 \times 10^4$  cellule/pozzetto) sono state piastrate all'interno del cestello. La co-cultura è stata posta in terreno DMEM 10%FBS con due diverse concentrazioni di glucosio: 5,5mM e 25mM (LG; HG) che simulano una condizione di normoglicemia e iperglicemia nell'uomo, rispettivamente. Dopo 3 giorni le cellule sono state raccolte per indagini successive.



*Figura 20: Riproduzione schematica di un modello di coltura 2D.*

#### 4.5 Colture 3D: Mammosfere

Per valutare la capacità delle MCF7 di formare mammosfere sono state utilizzate multiwell da 96 pozzetti Ultra-Low Attachment (Corning, NY, USA). In ogni pozzetto sono state piastrate 1 MSC e 4 cellule MCF7 (rapporto 1:5), in DMEM LG e HG supplementato con il 5% di MAMMOCULT MEDIUM (stem cell technology). Dopo 10 giorni è stata osservata la formazione delle mammosfere e la quantificazione del numero di sfere è stata ottenuta dalla seguente formula: (numero di sfere formate/numero di pozzetti contenenti le cellule) \*100.

Per valutare i livelli proteici di Oct4 e  $\alpha$ -Sma, le cellule sono state piastrate in piastre 100mm x20mm Ultra-Low Attachment (CORNING, NY, USA) in particolare  $1 \times 10^5$  MSC e  $4 \times 10^5$  cellule MCF7 (rapporto 1:5). La coltura 3D è stata posta in DMEM 5% FBS LG o HG e dopo 3 giorni le mammosfere formate sono state disgregate meccanicamente per ottenere singole cellule sottoposte successivamente ad analisi citofluorimetrica.

#### 4.6 Citofluorimetria

L'analisi dei marcatori mesenchimali sulle superficie delle MSC, isolate dalle biopsie di tessuto adiposo mammario, l'identificazione del pool  $CD44^{\text{high}}/CD24^{-\text{low}}$ , e la valutazione dell'espressione di proteica di Oct4 e  $\alpha$ -Sma è stata effettuata mediante citofluorimetria. Le cellule sono state raccolte in FALCON da 15 ml e centrifugate a 1300 rpm per 5 minuti. Il sedimento ottenuto è stato risospeso in 1ml di PBS 1X filtrato freddo. Dopo aver centrifugato a 350 rcf per 5 minuti a 4°C, le cellule sono state poi incubate a 4°C per 30 minuti al buio con specifici anticorpi o isotipi. Per i marcatori di superficie, le MSC sono state incubate con anticorpi anti-CD90 FITC, anti-CD29 PE, anti-CD106 FITC e anti-CD45 APC-Cy7 (BD Biosciences, USA). Per definire il pool di CSC, le MCF7 sono state incubate con gli anticorpi anti-CD44 APC e anti-CD24 PE (BD Biosciences, USA). Per la valutazione di Oct4 e  $\alpha$ -Sma, rispettivamente nelle MCF7 e MSC, le cellule ottenute dalla disgregazione delle mammosfere sono state incubate con gli anticorpi anti-citocheratina FITC, anti-Oct4 PE e anti- $\alpha$ -Sma PE (Cell Signaling Technology, USA), previa permeabilizzazione

con Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, USA). I campioni sono stati poi centrifugati a 350 rcf per 5 minuti a 4 C°, lavati con 1 ml di PBS 1X e poi risospesi in 300 µl di PBS 1X. Le cellule sono state processate al FACS BD LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) acquisendo 10<sup>4</sup> eventi per campione e analizzate utilizzando il software BD FACS Diva.

#### **4.7 Estrazione RNA**

Le MCF7 e MSC raccolte dalle colture 2D sono state centrifugate e il pellet ottenuto è stato lisato utilizzando QIAzol reagent (Qiagen Science, USA), una soluzione monofase di fenolo e guanidina isotiocianato. Il lisato è stato lasciato 5 min a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici conservando l'integrità dell'RNA. Successivamente, è stato aggiunto cloroformio (200 µL per ogni mL di Trizol) ed è stata effettuata una centrifugazione a 4°C per 15 minuti a 12.000 g. È stata ottenuta una separazione di fasi di cui quella superiore, acquosa, contenente l'RNA. Recuperata tale fase, l'RNA totale è stato precipitato mediante l'aggiunta di isopropanolo (500 µL per ogni mL di QIAzol), un'incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti ed una successiva centrifugazione a 4°C per 10' a 12.000 g. Il pellet di RNA è stato poi lavato con 75% etanolo (1mL per ogni mL di QIAzol) e nuovamente centrifugato a 4°C per 10' a 12.000 g. Eliminato il surnatante, il pellet di RNA, dopo una fase di asciugatura, è stato risospeso in acqua RNasi-free. Per la determinazione della concentrazione dei campioni (ng/µL) è stata misurata l'assorbanza a 260 nm (NanoDrop Technologies, USA); inoltre, è stato analizzato il loro grado di purezza in base al rapporto tra le assorbanze A260/A280 e A260/230 (di norma tra i valori 1,8-2,0).

#### 4.8 RT-PCR ed elettroforesi su gel di agarosio

L'RNA totale estratto è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando la Trascrittasi Inversa Superscript III ed oligo dT primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In particolare, a ciascun campione di RNA (1000 ng diluiti in acqua in un volume di 10  $\mu$ L) sono stati aggiunti: dNTP Mix (10 mM; 1  $\mu$ L), oligo dT primers (1  $\mu$ L), RTBuffer 5x (4  $\mu$ L), DTT (2  $\mu$ L), RNase OUT (1  $\mu$ L) e Trascrittasi Inversa Superscript III (1  $\mu$ L). I campioni sono stati posti in termociclatore (Biorad T100) e sottoposti a variazioni di temperatura controllate: 25°C per 5 minuti, 50° C per 60 minuti e 70°C per 15 minuti. L'integrità e la qualità dei campioni di cDNA ottenuti, è stata valutata amplificando una piccola regione trascritta (156 bp) di un gene housekeeping (ciclofilina; PPIA) mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) ed utilizzo di primers specifici (Forward: TACGGGTCCTGGCATCTTGT; Reverse: GGTGATCTTCTTGCTGGTCT).

Ciascuna reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando la Wonder Taq (EuroClone). La reazione è stata effettuata in un volume finale di 25  $\mu$ L utilizzando: acqua (16,7  $\mu$ L), 5X Wonder Taq Reaction buffer (5  $\mu$ L) (contenente 5mM di dNTP, 15mM MgCl<sub>2</sub>), reverse primer e forward primer 10  $\mu$ M (1  $\mu$ L) e Wonder Taq (0,3  $\mu$ L). Dopo una fase di attivazione iniziale (95° C per 1 minuto), la reazione di amplificazione è stata ottenuta mediante: una fase di denaturazione della doppia elica (95° C per 15 secondi), una successiva fase di appaiamento degli oligonucleotidi (ad una temperatura dipendente dalla lunghezza e dalla sequenza dei primers (2°C(A+T) + 4°C(G+C)) e per un tempo pari a 15 secondi) ed una fase di estensione per la sintesi della una nuova elica di DNA (72°C per un tempo scelto in base alla lunghezza dell'amplificato atteso, tenendo conto della processività della DNA polimerasi che nel caso della Wonder Taq è pari a 10-30 sec/kb). Il ciclo di denaturazione-appaiamento-estensione è stato ripetuto 30-40 volte in modo da raggiungere un'amplificazione soddisfacente della sequenza bersaglio. I campioni di RNA non retrotrascritti (ma sottoposti alle stesse condizioni ed alla stessa reazione di retrotrascrizione in assenza della retrotrascrittasi), sono stati utilizzati come stampo nelle reazioni di PCR per evidenziare l'eventuale presenza di amplificazioni "false positive" derivanti dal DNA e non dal cDNA. Inoltre, i campioni sottoposti alle

stesse condizioni di amplificazione, ma mancanti del cDNA stampo, sono stati utilizzati come controlli negativi di reazione. Gli amplificati ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio, preparato disciogliendo l'agarosio in tampone 1x Tris HCL-acido Acetico-EDTA (TAE), ad una concentrazione compresa tra 1,2 e 2%. Alla miscela è stato aggiunto il bromuro di etidio, un agente che si intercala tra le basi nucleotidiche cariche negativamente del DNA ed emette luce per fluorescenza se colpito da raggi UV a corta o media lunghezza d'onda. Il gel d'agarosio è stato posto in una cameretta elettroforetica contenente soluzione tampone (1% TAE) capace di condurre la corrente elettrica. I prodotti di PCR (5  $\mu$ L) sono stati addizionati con due coloranti (xilene cianolo e blu di bromofenolo) - per seguire la corsa elettroforetica dei campioni - e glicerolo - per la precipitazione dei campioni nei pozzetti del gel durante il caricamento. Oltre ai campioni, è stato caricato nel gel di agarosio anche un marcatore di peso molecolare noto. Il confronto tra la migrazione delle bande del marcatore con quelle dei campioni ha consentito di determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati. Alla cella elettroforetica, è stato applicato un voltaggio costante tra i 70 e i 100 mV per un minimo di 20 minuti ad un massimo di 1 ora. I prodotti sono stati poi visualizzati ponendo il gel al transilluminatore, grazie al quale è stato possibile osservare le bande fluorescenti.

#### **4.9 Quantitative Real Time PCR (qReal Time PCR)**

Le reazioni di qReal-Time PCR sono effettuate utilizzando la mix iTaq Universal SYBR Green (Biorad, Hercules, CA, USA), molecola che si intercala nel solco minore di molecole di DNA a doppia elica (dsDNA) ed è in grado di emettere fluorescenza se opportunamente stimolata. L'emissione di fluorescenza, direttamente proporzionale alla concentrazione di amplificato nella reazione è stata rilevata mediante l'uso di un termociclatore (CFX Connect Real Time System, Biorad) avente un rilevatore a fluorescenza che permette l'acquisizione in tempo reale della fluorescenza emessa dalle molecole sintetizzate. La miscela di reazione utilizzata è stata ottenuta aggiungendo a 2  $\mu$ L dei campioni di cDNA precedentemente ottenuti, i seguenti reagenti: iTaq Universal SYBR Green mix (5  $\mu$ L), primers di innesco (160

nM di ciascuno) ed acqua, in un volume finale di reazione di 10  $\mu$ L. Le sequenze dei primers utilizzati sono indicate in Tabella 2.

<b>PPIA</b>	<b>F 5'-TACGGGTCCTGGCATCTTGT</b>	<b>R 5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCT</b>
<b>SOX2</b>	<b>F 5'-CAACCAGAAAAACAGCCC G</b>	<b>R 5'-CAGCCGCTTAGCCTCGTC</b>
<b>NANOG</b>	<b>F 5'-CCTGAAGAAAACATCCATCC</b>	<b>R 5'-GTTCTGGTCTTCTGTTTCTTG</b>
<b>OCT4</b>	<b>F 5'-TCAGCCACATCGCCCAGC A</b>	<b>R 5'-AGGGAAAGGGACCGAGGA G</b>
<b>A-Sma</b>	<b>F 5'-AGAACATGGCATCATCACCA</b>	<b>R 5'-GAGTCATTTTCTCCCGTTG</b>

**Tabella 2: Oligonucleotidi di innesco utilizzati per le reazioni di PCR e qRT-PCR**

In particolare, la specificità e la funzionalità delle coppie di primers sono state precedentemente testate mediante PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio, come descritto nel paragrafo 4.8. I campioni sono stati sottoposti al seguente programma di amplificazione: (1) 95° C per 10 minuti, (2) 95° C per 15 secondi, (3) 60° C per 1 minuto. Gli stadi 2 e 3 sono stati ripetuti per 40 cicli. Immediatamente dopo, è stato eseguito un programma addizionale per determinare le curve di dissociazione degli ampliconi, usando parametri di default. Nel dettaglio, i prodotti finali sono stati esposti ad un gradiente di temperatura compresa tra 55° C e 90° C, tale da consentire la dissociazione dei prodotti attesi. Per ciascun campione, le curve di dissociazione hanno indicato amplificazione specifica dei prodotti di lunghezza attesa e assenza di prodotti multipli e contaminazioni, confermando quindi la correttezza e la specificità della reazione di amplificazione. L'espressione relativa dei geni in esame è stata misurata mediante l'applicazione del parametro  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . I livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando l'espressione del gene housekeeping PPIA come controllo interno.

#### ***4.10 Procedimenti statistici***

I dati sono stati riportati come valori medi di almeno 3 esperimenti indipendenti. I risultati sono stati analizzati mediante test t di student per valutarne la significatività statistica. È stato considerato statisticamente significativo ogni valore con p-value minore di 0,05.

## CAPITOLO 5

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il diabete mellito (DM) è una malattia molto comune, caratterizzata da iperglicemia cronica dovuta a difetti della secrezione e/o azione insulinica. Secondo l'International Diabetes Federation (IDF) attualmente 463 milioni di persone tra i 20 e 79 anni ne sono affette e si prevede che oltre 700 milioni di individui svilupperanno tale condizione entro il 2045(1).

L'iperglicemia persistente in tale patologia oltre a provocare danno e disfunzione di vari organi (reni, cuore, occhi, vasi sanguigni o nervi) risulta fortemente associata alla carcinogenesi (160-163). È stato infatti dimostrato che il DM (principalmente DM2) aumenta il rischio di insorgenza di numerosi tipi di cancro incluso il carcinoma alla mammella (160,5,7,8). È stato osservato, che pazienti affetti da DM2 mostrano un aumentato rischio di sviluppare il cancro al seno del 20% (33) e della mortalità ad esso associata del 50%.

Il tumore rappresenta la seconda causa di morte nel mondo e il cancro alla mammella risulta essere la prima causa di morte per cancro nelle donne e la terza (compresi gli uomini) dopo il tumore polmonare e al colon (26).

Considerata la forte incidenza di neoplasie nei soggetti diabetici, è di rilevante importanza comprendere i possibili fattori che collegano queste due patologie. Questa correlazione nonostante rappresenti un punto cruciale della ricerca necessita ancora di ulteriori studi.

La letteratura scientifica spiega ampiamente gli *effetti diretti* del glucosio sul fenotipo canceroso; esso rappresenta infatti un importante stimolo per l'insorgenza e la progressione neoplastica, ma la conoscenza degli effetti indiretti risulta attualmente lacunosa. In tal senso numerosi studi rivelano che il tumore possa generarsi e progredire non solo in risposta a cambiamenti genetici ed epigenetici, ma potrebbe generarsi "*indirettamente*" attraverso il microambiente che rappresenta l'ecosistema nel quale il tumore si sviluppa. Il microambiente

comprende cellule e tessuti adiacenti la massa cancerosa (72) e nel caso del carcinoma alla mammella è ampiamente rappresentato dal tessuto adiposo (73,74). È stato dimostrato il forte impatto della componente adiposa sullo sviluppo dei tumori al seno, poiché, mediante la secrezione di fattori di crescita e citochine (81,82), influenza vari aspetti della tumorigenesi, dall'invasione locale, all'insorgenza di metastasi e farmaco-resistenza (83). Infatti, recenti studi *in vitro* dimostrano che gli adipociti rispondono ad elevate concentrazioni di glucosio e acidi grassi (condizioni che si verificano in patologie come diabete ed obesità) e rilasciando alcune molecole, come l'IGF-1, la chemochina CCL5 e l'interleuchina 8 (IL-8), promuovono la proliferazione, la migrazione, l'invasività e la resistenza ai farmaci di cellule di carcinoma mammario (86-88).

Il tessuto adiposo oltre agli adipociti è sede della cosiddetta frazione vasculostromale che contiene numerosi tipi di cellule tra cui le cellule mesenchimali staminali (MSC) (75-77). Le MSC oltre ad intervenire nel rimodellamento tissutale grazie alla capacità di autorinnovarsi, potrebbero contribuire alla progressione neoplastica.

Sulla base delle attuali conoscenze che ancora non chiariscono gli *effetti indiretti* del glucosio sul fenotipo canceroso nelle neoplasie mammarie, il presente lavoro ha come scopo quello di comprendere l'impatto del glucosio sull'interazione tra cellule di carcinoma mammario e MSC al fine di valutare il suo potenziale ruolo nella progressione neoplastica considerando l'influenza del microambiente circostante.

Per questo studio sono state utilizzate cellule di carcinoma mammario positive per il recettore degli estrogeni (ER<sup>+</sup>) MCF7 e MSC isolate da biopsie di tessuto adiposo mammario (Ad-MS) di donne prive di alterazioni metaboliche, sottoposte a mastoplastica riduttiva. Ottenute le Ad-MS mediante una specifica metodica di isolamento, come descritto in Materiali e Metodi, esse sono state opportunamente caratterizzate valutando l'immunofenotipo e la capacità differenziativa. L'espressione di CD29 e CD90 e l'assenza di marcatori specifici di cellule endoteliali e immunitarie, CD106 e CD45 rispettivamente, sommata al potenziale differenziativo sia verso la linea adipocitaria che quella osteoblastica, ha confermato la natura staminale di tali cellule.

Per comprendere l'impatto del glucosio sull'interazione tra cellule MCF7 e Ad-MSC sono state esaminate due importanti caratteristiche; la multipotenza nelle Ad-MSC, e la staminalità delle cellule tumorali in quanto indice di aggressività. Le due popolazioni cellulari sono state poste in basse o alte concentrazioni di glucosio (LG/HG) assimilabili ad una condizione di normoglicemia e iperglicemia nell'uomo rispettivamente, in un sistema di colture 2D per favorire la comunicazione mediante lo scambio di metaboliti da loro stesse secreti. Dopo 3 giorni è stata valutata l'espressione di 3 geni di staminalità Oct4, Sox2 e Nanog, definiti anche "master regulator" della multipotenza.

I risultati hanno rivelato che il glucosio non modifica l'espressione dei geni analizzati in entrambe le popolazioni cellulari. Si osserva invece una riduzione dei livelli d'espressione di Nanog nelle Ad-MSC quando co-coltivate con le cellule tumorali in LG. L'informazione interessante è che solo nella co-coltura in HG si verifica una alterazione fenotipica di entrambi i tipi cellulari, indicata da una riduzione dell'espressione dei 3 geni nelle Ad-MSC e da un aumento di Oct4 nelle MCF7, suggerendo una possibile perdita di multipotenza delle cellule stromali adipose e un'acquisizione di staminalità delle cellule di carcinoma mammario.

Per chiarire tali cambiamenti sono state effettuate ulteriori valutazioni:

1) è stata esaminata la possibilità che le Ad-MSC, potessero aver acquisito nello specifico proprietà dei cosiddetti "*Fibroblasti Associati al Cancro*" (CAF), caratterizzati dalla presenza di una elevata espressione di  $\alpha$ -Sma; pertanto sono stati valutati i livelli d'espressione genica di tale marcatore;

2) è stato ricercato all'interno della popolazione tumorale il pool di MCF7 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-low</sup>, essendo tale fenotipo rappresentativo delle cosiddette "*Cancer stem cells*" (CSC) nel carcinoma alla mammella. Le CSC oltre a mostrare proprietà analoghe alle normali cellule staminali, come la capacità di auto-rinnovarsi in maniera indefinita; presentano specifiche caratteristiche che li predispongono alla farmacoresistenza, di conseguenza generano un fenotipo neoplastico più aggressivo.

I risultati rivelano che l'interazione con le cellule tumorali, indipendentemente dalle concentrazioni di glucosio, genera un aumento di espressione di  $\alpha$ -Sma nelle Ad-

MSC, acquisendo così caratteristiche fibroblastiche. Al contrario nelle MCF7, il pool di CSC aumenta in maniera significativa solo nella co-coltura in HG.

Il ruolo del glucosio nell'interazione tra tumore e stroma è stato confermato da ulteriori indagini. È stata utilizzata la tecnica delle colture 3D mediante la quale è possibile valutare la capacità delle cellule tumorali di crescere in maniera ancoraggio-indipendente formando strutture tridimensionali definite *mammosfere*. Tale metodica permette di definire *in vitro* il potenziale staminale di una cellula cancerosa che *in vivo* è effettivamente abile a crescere e sopravvivere anche se staccata dal tessuto di ancoraggio, contribuendo in tal modo alla formazione di metastasi.

È stato dunque osservato che le cellule MCF7 formano più mammosfere sia in HG che a contatto con le Ad-MSC; ma la combinazione di entrambe le condizioni potenzia fortemente tale capacità, esibendo così un fenotipo canceroso più “staminale” e potenzialmente più aggressivo.

Le mammosfere sono state successivamente disgregate e sulle singole cellule ottenute è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica per valutare i livelli proteici di  $\alpha$ -Sma nelle Ad-MSC e di Oct4 nelle MCF7. I risultati rivelano una transdifferenziazione delle Ad-MSC in CAF quando sono in contatto con le cellule tumorali, sebbene i livelli della proteina  $\alpha$ -Sma risultino più elevati in HG. L'espressione di Oct4 invece aumenta sia quando le MCF7 sono poste in HG che quando sono a contatto con le Ad-MSC, ma aumenta notevolmente in presenza di entrambe le condizioni.

Questo studio rivela quindi che indipendentemente dalle concentrazioni di glucosio, le cellule di carcinoma mammario sono capaci di modificare le cellule stromali adipose con le quali interagiscono al fine di favorire il loro stesso sostentamento. Ma la presenza di elevate concentrazioni di glucosio non solo potenzia tale effetto ma genera alterazioni che impattano sul microambiente in modo che possa non solo sostenere il fenotipo canceroso bensì renderlo più “staminale” e di conseguenza più aggressivo.

Alla luce di queste osservazioni, l'obiettivo finale è identificare i meccanismi

molecolari che correlano l'iperglicemia (principale caratteristica del diabete) con lo sviluppo di un fenotipo più aggressivo (mediato dal microambiente adiposo).

Sono ormai noti i fattori che correlano diabete e cancro, tra i quali fattori ormonali (insulina, IGF-1, adipochine, ecc.), la risposta immunitaria (infiammazione) o caratteristiche metaboliche (iperglicemia) (164,165).

Un numero crescente di evidenze suggerisce che il pathway di Wnt, modulato dalla  $\beta$ -catenina, rappresenti un potenziale link tra l'aumentato rischio di cancro (compreso il tumore alla mammella) e la presenza di uno stato metabolico alterato (166-172).

Uno studio dimostra che elevate concentrazioni di glucosio favoriscono la localizzazione nucleare della  $\beta$ -catenina, di conseguenza il signaling canonico di Wnt potrebbe spiegare l'aumentata frequenza del cancro associata al diabete (173). Il pathway rappresenta inoltre un importante segnale per l'induzione e il mantenimento della staminalità di cellule tumorali comprese quelle di mammella, in quanto agisce a vari livelli, ovvero attivando l'espressione di geni di staminalità quali Oct4, c-Myc, Nanog, Sox2, marcatori di CSC quali CD44, inducendo la formazione di sfere in vitro, promuovendo la proliferazione, invasività e transizione epitelio-mesenchimale (174-176). La letteratura ci fornisce informazioni relative anche al microambiente, un esempio è dato dai CAF. Essi infatti favoriscono l'attività delle CSC nel cancro alla mammella; possono secernere varie molecole inclusi i ligandi di Wnt all'interno di esosomi che agendo sulle cellule tumorali attivano la transizione epitelio-mesenchimale, l'insorgenza di metastasi e aumento di staminalità (176-178). Anche le cellule di carcinoma mammario mediante specifici ligandi di Wnt, possono indurre la transdifferenziazione di cellule stromali residenti in CAF in maniera TGF- $\beta$  dipendente (177).

In base a queste evidenze ed a esperimenti preliminari, è verosimile che la via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina rappresenti un possibile meccanismo che possa spiegare l'impatto del glucosio sull'interazione tra cellule di carcinoma mammario e Ad-*MSC*. I risultati preliminari hanno infatti rivelato che nelle colture 2D, l'attività del pathway risulta aumentata nelle MCF7 solo quando co-coltivate con le Ad-*MSC* in HG.

Queste osservazioni necessitano di ulteriori indagini a supporto, ma consentono di ipotizzare che il glucosio, presumibilmente mediante la via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, possa alterare l'interazione tra cellule di carcinoma mammario e MSC del microambiente adiposo, inducendo modifiche fenotipiche in entrambi tipi cellulari che oltre a favorire e sostenere il fenotipo tumorale lo rendono più aggressivo. Quindi, sfruttare le evidenze di questo lavoro di dottorato per identificare i meccanismi molecolari potenzialmente implicati nella correlazione tra diabete e cancro, potrebbe fornire ulteriori conoscenze al fine di individuare nuove terapie per il trattamento di soggetti diabetici affetti da carcinoma mammario, o di identificare nuovi marcatori nel tessuto adiposo peri-neoplastico che possano predire l'evoluzione della neoplasia.

## REFERENZE

1. International Diabetes Federation. 2019. Available at: <http://www.idf.org/home>
2. American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care January 2013, 36: S67-S74.
3. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. Adv Cardiol 2008; 45:1-16.
4. Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC: Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. JAMA 2004; 291: 335–342.
5. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. Endocr Relat Cancer 2009; 16:1103-23.
6. Freisling H, Arnold M, Soerjomataram I, O'Doherty MG, Ordóñez-Mena JM, Bamia, Ellen Kampman C, Leitzmann M, Isabelle Romieu, Kee F, Tsilidis K, Tjønneland A, Trichopoulou A, Boffetta P, Benetou V, Bueno-de-Mesquita H B, Huerta JM, Brenner H, Wilsgaard T, Jenab M. Comparison of general obesity and measures of body fat distribution in older adults in relation to cancer risk: meta-analysis of individual participant data of seven prospective cohorts in Europe. British Journal of Cancer volume 116, pages1486–1497(2017).
7. Kimberly S. Peairs, Bethany B. Barone, Claire F. Snyder, Hsin-Chieh Yeh, Kelly B. Stein, Rachel L. Derr, Frederick L. Brancati, and Antonio C. Wolff. Diabetes Mellitus and Breast Cancer Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Clinical Oncology (1), 40-6 (2011).
8. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. Am J Epidemiol 2004; 159:1160-7.
9. Lipscombe LL, Goodwin PJ, Zinman B, McLaughlin JR, Hux JE. The impact of diabetes on survival following breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2008; 109:389-95.
10. Barone, Bethany B.; Hsin Chieh Yeh; Snyder, Claire F.; Peairs, Kimberly S.; Stein, Kelly B.; Derr, Rachel L.; Wolff, Antonio C.; Brancati, Frederick L. Long-term all-

- cause mortality in cancer patients with pre - existing diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2008; 300:2754-64.
11. Stattin, Pär; Björ, Ove; Ferrari, Pietro; Lukanova, Annekatrin; Lenner, Per; Lindahl, Bernt; Hallmans, Göran; Kaaks, Rudolf. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. *Diabetes Care* 2007; 30:561-7.
  12. Zhou, X.; Qiao, Q.; Zethelius, B.; Pyörälä, K.; Söderberg, S.; Pajak, A.; Stehouwer, C.; Heine, R.; Jousilahti, P.; Ruotolo, G.; Nilsson, P.; Calori, G.; Tuomilehto, J. Diabetes, prediabetes and cancer mortality. *Diabetologia* 2010; 53: 1867-76.
  13. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029-33.
  14. Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucoselowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52:1766-77.
  15. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:798-809.
  16. Turturro F, Friday E, Welbourne T. Hyperglycemia regulates thioredoxin-ROS activity through induction of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in metastatic breast cancer-derived cells MDAMB-231. *BMC Cancer* 2007; 7:96.
  17. van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:2569-78.
  18. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.*2003;95:1218-26.
  19. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007;121:2381-6.
  20. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factoralpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006; 42:745-50.
  21. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105:311-20.
  22. Shi Y, Hu FB. The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* 2014; 383(9933):1947-8.

23. Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140:19–24.
24. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:579-91.
25. Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njølstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med* 2011; 364(9):829-41.
26. Macciò A, Madeddu C, Mantovani G. Adipose tissue as target organ in the treatment of hormone-dependent breast cancer: new therapeutic perspectives. *Obes Rev* 2009; 10(6):660-70.
27. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15; 144(8):1941-1953.
28. Weiderpass E, Gridley G, Persson I, Nyren O, Ekblom A, Adami HO. Risk of endometrial and breast cancer in patients with diabetes mellitus. *International Journal of Cancer* 1997; 71:360–363.
29. Wideroff L, Gridley G, Mellekjaer L, Chow WH, Linet M, Keehn S, Borch-Johnsen K, Olsen JH. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89:1360–1365.
30. Michels KB, Solomon CG, Hu FB, Rosner BA, Hankinson SE, Colditz GA, Manson JE. Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes Care* 2003; 26:1752–1758.
31. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *American Journal of Epidemiology* 2004; 159 1160–1167.
32. Silvera SA, Jain M, Howe GR, Miller AB, Rohan TE. Dietary carbohydrates and breast cancer risk: a prospective study of the roles of overall glycemic index and glycemic load. *International Journal of Cancer* 2005; 114:653–658.

33. Talamini R, Franceschi S, Favero A, Negri E, Parazzini F, La Vecchia C. Selected medical conditions and risk of breast cancer. *British Journal of Cancer* 1997; 75:1699–1703.
34. Baron JA, Weiderpass E, Newcomb PA, Stampfer M, Titus-Ernstoff L, Egan KM, Greenberg ER. Metabolic disorders and breast cancer risk (United States). *Cancer Causes and Control* 2001; 12:875–880.
35. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cancer* 2007; 121:856– 862
36. Coebergh JW, Janssen-Heijnen ML, Post PN, Razenberg PP. Serious co-morbidity among unselected cancer patients newly diagnosed in the southeastern part of The Netherlands in 1993–1996. *Journal of Clinical Epidemiology* 1999; 52 1131–1136.
37. Yancik R, Wesley MN, Ries LA, Havlik RJ, Edwards BK, Yates JW. Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older. *Journal of the American Medical Association* 2001; 285:885–892.
38. Lubin JH, Burns PE, Blot WJ, Ziegler RG, Lees AW, Fraumeni JF Jr. Dietary factors and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* 1981; 28:685–689.
39. Landa MC, Frago N, Tres A. Diet and the risk of breast cancer in Spain. *European Journal of Cancer Prevention* 1994; 3:313–320.
40. Potischman N, Coates RJ, Swanson CA, Carroll RJ, Daling JR, Brogan DR, Gammon MD, Midthune D, Curtin J, Brinton LA. Increased risk of early- stage breast cancer related to consumption of sweet foods among women less than age 45 in the United States. *Cancer Causes and Control* 2002; 13:937– 946.
41. Tavani A, Giordano L, Gallus S, Talamini R, Franceschi S, Giacosa A, Montella M, La Vecchia C. Consumption of sweet foods and breast cancer risk in Italy. *Annals of Oncology* 2006; 17:341–345.
42. Krone CA, Ely JT. Controlling hyperglycemia as an adjunct to cancer therapy. *Integr Cancer Ther* 2005; 4:25-31.
43. Carroll KK. Dietary factors in hormone-dependent cancers. *Curr Concepts Nutr* 1977; 6:25-40.
44. Hems G. The contributions of diet and childbearing to breast-cancer rates. *Br J Cancer* 1978; 37 974-982.

45. Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(3):237-48.
46. Ryu TY, Park J, Scherer PE. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J* 2014; 38(5):330-6.
47. Joana Monteiro, Riccardo Fodde. Cancer stemness and metastasis: Therapeutic consequences and perspectives. *European Journal of Cancer* 46 (2010) 1198–1203
48. American Society of Hematology, di Dick JE (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112(13): 4793-4807.
49. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105-11
50. Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL, Wu CL. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(15):6281–6291
51. Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res*. 2008;68(16):6533–6540
52. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005;65(13):5506–5511.
53. R.J. Kathawala, P. Gupta, C.R.J. Ashby, Z.S. Chen. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade *Drug Resist. Updat.*, 18 (2015), pp. 1-17
54. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105–111.
55. Tsvee Lapidot, Christian Sirard, Josef Vormoor, Barbara Murdoch, Trang Hoang, Julio Caceres-Cortes, Mark Minden, Bruce Paterson, Michael A. Caligiuri, John E. Dick A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* volume 367, pages 645–648(1994)
56. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730–737

57. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988.
58. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-5828.
59. Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., et al. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 973–978.
60. Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., et al. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037.
61. Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., et al. (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 25(12).
62. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121:823-835.
63. Lin Zhang; Jia Huang; Nuo Yang; Joel Greshock; Molly S. Megraw; Antonis Giannakakis; Shun Liang; Tara L. Naylor; Andrea Barchetti; Michelle R. Ward; George Yao; Angelica Medina; Ann O'brien-Jenkins; Dionyssios Katsaros; Artemis Hatzigeorgiou; Phyllis A. Gimotty; Barbara L. Weber; George Coukos. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:9136-9141.
64. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68:4311-4320.
65. Lang SH, Frame F, Collins A. Prostate cancer stem cells. *J Pathol* 2009; 217:299-306.

66. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006; 124:1111–1115.
67. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441:1068-1074.
68. Michael Kahn. Symmetric Division Versus Asymmetric Division: A Tale of Two Coactivators. *Future Med Chem*, 3(14), 1745-63, Oct 2011
69. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*. 2003; 63:5821–5828
70. Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Developmental biology*. 1996;175(1):1–13.
71. Gabriela Dontu , Wissam M Abdallah, Jessica M Foley, Kyle W Jackson, Michael F Clarke, Mari J Kawamura, Max S Wicha. In Vitro Propagation and Transcriptional Profiling of Human Mammary (Stem/Progenitor Cells. *Genes Dev*, 17 (10) 1253-70
72. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:839–849.
73. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):579-91
74. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(10):1533-41.
75. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95
76. Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR, Ashammakhi N. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering. Ashammakhi N, Reis R, Chiellini F, editors. *Applications Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4. Oulu, Finland: University of Oulu; 2008. p. 1-26
77. Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. Adipocyte Differentiation. In: Symonds ME, editor. *Adipose Tissue Biology*. New York: Springer; 2012.p. 17-38

78. Park J, Euhus DM, Scherer PE. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev.* 2011; 32:550–570.
79. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316(2):129-39
80. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323(1):20-34
81. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(10):1533-41.
82. Wang YY, Lehuédé C, Laurent V, Dirat B, Dauvillier S, Bochet L, et al. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* 2012; 324:142–151.
83. Puneeth Iyengar, Terry P Combs, Shalin J Shah, Valérie Gouon-Evans, Jeffrey W Pollard, Chris Albanese, Louise Flanagan, Martin P Tenniswood, Chandan Guha, Michael P Lisanti, Richard G Pestell, Philipp E Scherer. Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* (2003) 22, 6408–6423
84. Bifulco M, Pisanti S. “Adiponcosis”: a new term to name the obesity and cancer”link.*JClin Endocrinol Metab.* 2013 Dec;98(12):4664-5.
85. Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol.* 2008; 456:1-22
86. D'Esposito V, Passaretti F, Hammarstedt A, Liguoro D, Terracciano D, Molea G, Canta L, Miele C, Smith U, Beguinot F, Formisano P. Adipocyte-released insulin-like growth factor-1 is regulated by glucose and fatty acids and controls breast cancer cell growth in vitro. *Diabetologia.* 2012 Oct;55(10):2811-22.
87. D'Esposito V, Liguoro D, Ambrosio MR, Collina F, Cantile M, Spinelli R, Raciti GA, Miele C, Valentino R, Campiglia P, De Laurentiis M, Di Bonito M, Botti G, Franco R, Beguinot F, Formisano P. Adipose microenvironment promotes triple negative breast cancer cell invasiveness and dissemination by producing CCL5. *Oncotarget.* 2016 Apr 26;7(17):24495-509

88. Ambrosio MR, D'Esposito V, Costa V, Liguoro D, Collina F, Cantile M, Prevete N, Passaro C, Mosca G, De Laurentiis M, Di Bonito M, Botti G, Franco R, Beguinot F, Ciccodicola A, Formisano P. Glucose impairs tamoxifen responsiveness modulating connective tissue growth factor in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Nov 20;8(65):109000-109017.
89. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-74.
90. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
91. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Jun;226(6):507-20.
92. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Mar 4;100(5):2397-402
93. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-74.
94. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):896-904.
95. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2615-25.
96. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001 Dec;128(24):5181-8.
97. Q Chen, P Shou, C Zheng, M Jiang, G Cao, Q Yang, J Cao, N Xie, T Velletri, X Zhang, C Xu, L Zhang, H Yang, J Hou, Y Wang, Y Shi. Fate decision of

- mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death & Differentiation* (2016) 23, 1128–1139
98. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):54-63.
99. L. E. Kokai, K. Marra, and J. P. Rubin, “Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration,” *Translational Research*, vol. 163, no. 4, pp. 399–408, 2014.
100. S. E. Hanson, J. Kim, and P. Hematti, “Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue,” *Aesthetic Surgery Journal*, vol. 33, no. 6, pp. 888–898, 2013.
101. J. Kim, L. E. Escalante, B. A. Dollar, S. E. Hanson, and P. Hematti, “Comparison of breast and abdominal adipose tissue mesenchymal stromal/stem cells in support of proliferation of breast cancer cells,” *Cancer Investigation*, vol. 31, no. 8, pp. 550–554, 2013.
102. S. Schlosser, C. Denmler, R. Schweizer et al., “Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin,” *Microvascular Research*, vol. 83, no. 3, pp. 267–275, 2012
103. S. Kidd, E. Spaeth, J. L. Dembinski et al., “Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging,” *Stem Cells*, vol. 27, no. 10, pp. 2614–2623, 2009.
104. Y. Zhang, A. C. Daquinag, F. Amaya-Manzanares, O. Sirin, C. Tseng, and M. G. Kolonin, “Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment”. *Cancer Research*, vol. 72, no. 20, pp. 5198–5208, 2012.
105. L. Kucerova, S. Skolekova, M. Matuskova, M. Bohac, and Z. Kozovska, “Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells,” *BMC Cancer*, vol. 13, article 535, 2013.

106. L. Kucerova, V. Altanerova, M. Matuskova, S. Tyciakova, and C. Altaner, "Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy," *Cancer Research*, vol. 67, no. 13, pp. 6304–6313, 2007.
107. L. Prantl, F. Muehlberg, N. M. Navone et al., "Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth," *The Prostate*, vol. 70, no. 15, pp. 1709–1715, 2010.
108. Karnoub, A. B. Dash, A. P. Vo et al., "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis". *Nature* vol. 449, no. 7162, pp. 557–563, 2007.
109. M. I. N. Y. Park, Y. O. O. S. Hong, and K. I. M. Sung-Hyun, "Adipose-derived stem cells induced EMT-like changes in H358 lung cancer cells," *Anticancer Research*, vol. 33, no. 10, pp. 4421–4430, 2013.
110. F. Djouad, P. Plence, C. Bony et al., "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals," *Blood*, vol. 102, no. 10, pp. 3837–3844, 2003.
111. L. V. Rhodes, S. E. Muir, S. Elliott et al., "Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 121, no. 2, pp. 293–300, 2010.
112. F. L. Muehlberg, Y.-H. Song, A. Krohn et al., "Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 4, pp. 589–597, 2009
113. L. V. Rhodes, J.W. Antoon, S. E. Muir, S. Elliott, B. S. Beckman, and M. E. Burow, "Effects of human mesenchymal stem cells on ER-positive human breast carcinoma cells mediated through ER-SDF-1/CXCR4 crosstalk," *Molecular Cancer*, vol. 9, article 295, 2010.
114. Tu B, Du L, Fan QM, Tang Z, Tang TT. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2012 Dec 1;325(1):80-8.
115. Yang Y, Otte A, Hass R. Human mesenchymal stroma/stem cells exchange membrane proteins and alter functionality during interaction with different tumor cell lines. *Stem Cells Dev.* 2015;24(10):1205–22.

116. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E, Liu W, Arlinghaus RB, Alt EU. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. 2009 Apr;30(4):589-97.
117. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557-63
118. Gwendal Lazennec Paula Y. Lam. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1866 (2016) 290-299
119. Tarin D. (1969). Fine structure of murine mammary tumours: the relationship between epithelium and connective tissue in neoplasms induced by various agents. *Br J Cancer* 23: 417-425.
120. Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., and Brown R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 349-363.
121. Polyak K., and Kalluri R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010: 30.
122. De Weber O, Demetter P, Mareel M, and Bracke M (2008). Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123: 2229-2238.
123. Gabbiani G, Ryan G., and Majne G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549-550.
124. Kalluri R, and Zeisberg M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401.
125. Sappino A.P, Skalli O, Jackson B, Schurch W, and Gabbiani G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer* 41: 707-712.
126. Dvorak H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659.

127. Allinem, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M., Chin L, Richardson A, et al., (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6: 17-32.
128. Bauer M., Su G., Casper C., He R., Rehrauer W., and Friedl A. (2010). Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene* 29: 1732-1740.
129. Sadlonova A., Bowe D.B., Novak Z., Mukherjee S., Duncan V.E., Page G.P., and Frost A.R. (2009). Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron* 2: 9-21.
130. Hawsawi N.M., Ghebeh H., Hendrayani S.F., Tulbah A., Al-Eid M., Al-Tweigeri T., Ajarim D., Alaiya A., Dermine S., and Aboussekhra A. (2008). Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes. *Cancer Res* 68: 2717-2725
131. Kojima Y., Acar A., Eaton E.N., Mellody K.T., Scheel C., Ben-Porath I., Onder T.T., Wang Z.C., Richardson A.L., Weinberg R.A., et al., (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20009-20014.
132. Cheng J.D., and Weiner L.M. (2003). Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A. M. Scott *et al.*, A Phase I dose-escalation study of sibtuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9: 1639-1647, 2003. *Clin Cancer Res* 9: 1590-1595.
133. Shekhar M.P., Werdelli J., Santner S.J., Pauley R.J., and Tait L. (2001). Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 61: 1320-1326.
134. Trimis G., Chatzistamou I., Politi K., Kiaris H., and Papavassiliou A.G. (2008). Expression of p21waf1/Cip1 in stromal fibroblasts of primary breast tumors. *Hum Mol Genet* 17: 3596-3600.

135. Camps J.L., Chang S.M., Hsu T.C., Freeman M.R., Hong S.J., Zhau H.E., Von Eschenbach A.C., and Chung L.W. (1990). Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 75-79.
136. Hu, M., Peluffo G., Chen H., Gelman R., Schnitt S., and Polyaj K. (2009). Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3372-3377.
137. Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., Carey V.J., Richardson A.L., and Weinberg R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-348.
138. Rozenchan P.B., Carraro D.M., Brentani H., De Carvalho Mota L.D., Bastos E.P., Eferreira E.N., Torres C.H., Katayama M.L., Roela R.A., Lyra E.C., et al., (2009). Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *Int J Cancer* 125: 2767-2777.
139. Huang M., Li Y., Zhang H., and Nan F. (2010). Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29: 80.
140. Kojima Y., Acar A., Eaton E.N., Mellody K.T., Scheel C., Ben-Porath I., Onder T.T., Wang Z.C., Richardson A.L., Weinberg, et al., (2010). Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 20009-20014.
141. Polyak K., and Weinberg R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273.
142. Potenta S., Zeisberg E., and Kalluri R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 99: 1375-1379.
143. Zeisberg E., Potenta S., Xie L., Zeisberg, M., and Kalluri R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67: 10123-10128.

144. Kalluri R., and Weinberg R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-1428.
145. Massague J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215-230.
146. El-Haibi C.P., and Karnoub A.E. (2010). Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 399-409.
147. Spaeth E.L., Dembinski J.L., Sasser A.K., Watson K., Klopp A., Hall B., Andreeff M., and Marini F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4: e4992.
148. Mishra P.J., Mishra P.J., Humeniuk R., Medina D.J., Alexe G., Mesirov J.P., Ganesan S., Glod J.W., and Banerjee D. (2008). Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 4331-4339.
149. Jeon E.S., Moon H.J., Lee M.J., Song H.Y., Kim Y.M., Cho M., Suh D.S., Yoon M.S., Chang C.L., Jung J.S., et al., (2008). Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 26: 789-797.
150. Abdelilah Aboussekhra. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 841-849
151. Finak G., Bertos N., Pepin F., Sadekova S., Souleimanova M., Zhao H., Chen H., Omeroglu G., Meterissian S., Omeroglu A., et al., (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14: 518-527.
152. Farmer P., Bonnefoi H., Anderle P., Cameron D., Wirapati P., Becette V., Andre S., Piccart M., Campone M., Brain E., et al (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 15: 68-74.
153. Hasebe T., Tamura N., Okada N., Hojo T., Akashi-Tanaka S., Shimizu C., Tsuda H., Shibata T., Sasajima Y., Iwasaki M., et al., (2010). p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy. *Hum Pathol* 41: 262-270.

154. Kobayashi T., Tsuda H., Moriya T., Yamasaki T., Kikuchi R., Ueda S., Omata J., Yamamoto J., and Matsubara O. (2009). Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 123: 733-745.
155. Yamashita M., Ogawa T., Zhang X., Hanamura N., Kashikura Y., Takamura M., Yoneda M., and Shiraishi T. (2010). Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* 2010: 27.
156. Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*. **51** (5): 1409–1416
157. Lacroix M, Leclercq G (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". *Breast Cancer Res Treat*. 83 (3): 249-289
158. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G (2006). "p53 and breast cancer, an update". *Endocrine-Related Cancer*. 13 (2): 293–325.
159. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004. 329(1):77-84.
160. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 2010; 33: 1674-1685
161. Jee SH, Ohrr H, Sull JW et al. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA* 2005; 293: 194-202
162. Tseng KS, Lin C, Lin YS et al. Risk of head and neck cancer in patients with diabetes mellitus: a retrospective cohort study in Taiwan. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 140: 746-753
163. Noto H, Tsujimoto T, Sasazuki T et al. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Pract* 2011; 17: 616-628
164. Lukanova A. et al. Prediagnostic plasma testosterone, sex hormone-binding globulin, IGF-I and hepatocellular carcinoma: etiological factors or risk markers? *Int. J. Cance*. 134, 164–173 (2014).

165. Chao L. T. et al. Insulin, glucose, and hepatocellular carcinoma risk in male hepatitis B carriers: results from 17-year follow-up of a population-based cohort. *Carcinogenesis* 32, 876–881 (2011).
166. White B. D. et al. Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterol.* 142, 219–232 (2012).
167. García-Jiménez C., García-Martínez J. M., Chocarro-Calvo A. & De la Vieja A., A. new link between diabetes and cancer: enhanced WNT/ $\beta$ -catenin signaling by high glucose. *J. Mol. Endocrinol.* 52, 51–66 (2013).
168. Mi-Hyun K., Seung-Hyun H. & Moon Kyu L. Insulin Receptor-Overexpressing  $\beta$ -Cells Ameliorate Hyperglycemia in Diabetic Rats through Wnt Signaling Activation. *PLoS One* 8, e67802 (2013).
169. Brabletz T., Jung A., Dag S., Hlubek F. & Kirchner T.  $\beta$ -Catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* 155, 1033–1038 (1999).
170. Chocarro-Calvo A., García-Martínez J. M., Ardila-González S., De la Vieja A. & García-Jiménez C. Glucose-induced  $\beta$ -catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol. Cell* 49, 474–486 (2013)
171. Vaira S., Friday E., Scott K., Conrad S. & Turturro F. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mediate the “glucose sensor” mechanism in metastatic breast cancer-derived cells MDA-MB-231. *Journal Cell Physiol.* 227, 578–586 (2012).
172. Ana Chocarro-Calvo, Jose Manuel, García-Martínez, Soraya Ardila González, Antonio De la Vieja, Custodia García-Jiménez. Glucose-Induced  $\beta$ -Catenin Acetylation Enhances Wnt Signaling in Cancer. *Molecular Cell.* 49 (3), 474-86, (2013)
173. Lamb R., Ablett M.P., Spence K., Landberg G., Sims A.H., Clarke R.B. Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS ONE.* 2013;8: e67811. doi: 10.1371/journal.pone.0067811).
174. Ayyanan A, Civenni G, Ciarloni L, Morel C, Mueller N, et al. (2006) Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast

- epithelial cells by a Notch-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3799–3804.)
175. Scheel C, Eaton EN, Li SH, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell*, 145 (6), 926-40, 2011
  176. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun.* 2016; 7:10305).
  177. Chen Y, Zeng C, Zhan Y, Wang H, Jiang X, Li W. Aberrant low expression of p85alpha in stromal fibroblasts promotes breast cancer cell metastasis through exosome-mediated paracrine Wnt10b. *Oncogene.* 2017; 36:4692-4705.
  178. Valenti G, Quinn HM, Heynen G, et al. Cancer stem cells regulate cancer-associated fibroblasts via activation of Hedgehog signaling in mammary gland tumors. *Can Res.* 2017; 77:2134-2147.

## LISTA PUBBLICAZIONI

- Ambrosio MR, D'Esposito V, Costa V, Liguoro D, Collina F, Cantile M, Prevete N, Passaro C, **Mosca G**, De Laurentiis M, Di Bonito M, Botti G, Franco R, Beguinot F, Ciccodicola A, Formisano P. Glucose impairs tamoxifen responsiveness modulating connective tissue growth factor in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Nov 20;8(65):109000-109017. doi: 10.18632/oncotarget.22552. eCollection 2017 Dec 12
- Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R, Borriello F, Granata F, **Mosca G**, Passaretti F, Sammartino JC, Beguinot F, Sammartino G, Formisano P, Riccitiello F. White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. *Platelets*. 2018 Jul;29(5):463-467. doi: 10.1080/09537104.2017.1319046. Epub 2017 Jun 21



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



Dottorando	<b>Dr.ssa Mosca Giusy</b>
Tutor	<b>Prof. Pietro Formisano</b>
Coordinatore	<b>Prof. Francesco Beguinot</b>
Corso di Dottorato	<b>Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Sperimentale</b>
Ciclo	<b>32°</b>
Codice borsa	<b>DOT1318210 - Borsa 1</b>
CUP	<b>E66J17000250006</b>
Titolo Progetto	<b>Il glucosio modula l'interazione tra cellule di carcinoma mammario e cellule mesenchimali staminali del tessuto adiposo</b>

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo

