

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento dell'uomo"**

XXI ciclo

Coordinatore: Prof. Claudio Pignata

Tesi di Dottorato

***"Nuovi fattori prognostici e terapeutici nel Carcinoma
Endometriale"***

**Tutore
Prof. C. Di carlo**

**Candidato
Dott.ssa M. Borriello**

Anno Accademico 2007/2008

Indice

Introduzione

- Il carcinoma dell'endometrio pag. 3
- Il sistema degli endocannabinoidi pag. 30
- Espressione di CD 133-1 e CD133-2 pag. 43

I linea di ricerca: modulazione del sistema endocannabinoide nella carcinogenesi endometriale.

- Scopo della ricerca pag. 46
- Risultati:
 - “Activation of the endocannabinoid system in endometrial carcinoma: possible role in cancer cell growth control of cannabinoid CB2 receptor.” pag. 48

II linea di ricerca: Isolamento e caratterizzazione biologica di cellule staminali tumorali nel carcinoma.

- Scopo della ricerca pag. 71
- Risultati:
 - “Expression of CD 133-1 and Cd 133-2 in Endometrial Cancer ” pag. 72

Discussione pag. 91

Bibliografia pag. 98

Introduzione

Il Carcinoma dell'Endometrio

Il carcinoma dell'endometrio rappresenta il tumore ginecologico più frequente nei Paesi Occidentali. Ogni anno i casi di carcinoma endometriale ed i decessi sono rispettivamente 142.000 e 42.000 nel mondo, 25.000 e 9.000 in Europa, e 5.000 e 1.700 in Italia. E' stato stimato dall'American Cancer Society, che ogni anno, negli Stati Uniti, il cancro dell'utero compare in 361000 donne, il che lo rende il quarto cancro più comune. In Italia, l'incidenza del carcinoma endometriale è pari al 5-6% dei tumori femminili con circa 4000 nuovi casi annui. Insorge prevalentemente in età post-menopausale, con incidenza massima tra i 55 ed i 65 anni. Tuttavia il 20-25% verrà diagnosticato prima della menopausa e il 5% prima dei 40 anni.

Uno screening per il carcinoma dell'endometrio non è di alcun provato vantaggio; di nessun test di screening è stato valutato l'impatto sulla mortalità per carcinoma endometriale e le raccomandazioni, pubblicate finora, di sottoporre a screening alcuni gruppi di donne ad alto rischio, sono basate su opinioni personali e su benefici presunti. Il Pap-test, utilizzato con successo per lo screening del carcinoma della cervice uterina, è troppo poco sensibile per l'individuazione del carcinoma endometriale per essere utilizzato come metodica di screening. Tuttavia la presenza di cellule

endometriali nel Pap-test di una donna in post-menopausa che non fa uso di terapia sostitutiva, è di per sé un fatto anomalo e richiede ulteriori accertamenti. Il citoaspirato endometriale è stato proposto come potenziale tecnica di screening. Uno studio che valutava l'efficacia della citologia endometriale in pazienti asintomatiche come metodo di screening, ne ha stimato la sensibilità intorno all'80%. La maggiore frequenza del carcinoma endometriale si osserva in donne in postmenopausa, obese, nullipare, infertili o con storia di irregolarità mestruali.

Sono stati identificati numerosi fattori di rischio (Tabella 1).

TABELLA 1

Fattori di rischio per il Carcinoma Endometriale

Età
Menarca precoce
Menopausa tardiva
Nulliparità
Infertilità
Irregolarità mestruali (menorragia, menometrorragia)
Anovularietà cronica
Disfunzione ovarica (PCOS)
Esposizione sbilanciata ad estrogeni esogeni
Terapia con tamoxifene
Tumori della teca e della granulosa
Anamnesi positiva per carcinoma mammario (BRCA1/BRCA2) c
Obesità
Diabete mellito
Ipertensione arteriosa con o senza coronaropatie

Elemento comune a molte delle condizioni fisiopatologiche predisponenti è la capacità di determinare un clima endocrino prevalentemente estrogenico in assenza di un adeguato bilanciamento progestinico. In queste donne

l'iperstimolazione estrogeno indotta determina una serie di modificazioni dell'endometrio che iniziano con l'iperplasia per arrivare, attraverso una serie di ulteriori alterazioni, dal potenziale sempre più maligno, alle manifestazioni tipiche del carcinoma endometriale.

La quantità di grasso corporeo è stata associata ai livelli circolanti diminuiti sia del progesterone sia delle proteine leganti gli ormoni sessuali (SHBG). I livelli della SHBG diminuiscono progressivamente con l'aumentare della localizzazione del grasso nella parte superiore del corpo. Con SHBG più basse esiste una produzione endogena di estradiolo non legato a proteine. Il diabete mellito e l'ipertensione sono frequentemente associati al cancro dell'endometrio. Un'associazione consistente è stata evidenziata tra tumori dell'ovaio secernenti estrogeni (tumori a cellule della granulosa) e carcinoma endometriale. Le donne in postmenopausa che assumono estrogeni da soli hanno un rischio elevato di sviluppare un carcinoma endometriale. Fortunatamente l'aggiunta di un progestinico sembra avere un'azione protettiva. Nota è l'associazione tra utilizzo di tamoxifene e cancro dell'endometrio. Il Tamoxifene, sebbene classificato come antiestrogeno, è noto avere proprietà estrogeniche; sull'utero esso determina spesso un'atrofia cistica, un'iperplasia oppure la formazione di polipi endometriali. L'uso del tamoxifene aumenta il rischio relativo di carcinoma endometriale di 7 volte e tale aumento è dose e durata dipendente. Un aumento del rischio di

carcinoma endometriale è stato riscontrato nelle pazienti con carcinoma del colon-retto ereditario non poliposico; in queste donne il rischio relativo può raggiungere il 43% a 70 anni. Le donne che assumono contraccettivi per almeno dodici mesi hanno un rischio relativo dimezzato di sviluppare un cancro dell'endometrio. La protezione continua per almeno 10 anni dopo l'assunzione dei contraccettivi ed è più evidente nelle nullipare. Altri fattori protettivi sono la multiparità, la menopausa precoce, il peso normale ed il fumo di sigaretta. Sebbene il fumo apparentemente riduca il rischio di sviluppare un cancro dell'endometrio di stadio precoce, questo vantaggio è fortemente superato dall'aumentato rischio di cancro dei polmoni e di altri importanti rischi per la salute associati al fumo di sigaretta.

L'adenocarcinoma dell'endometrio può originare da un endometrio normale, atrofico o iperplastico. Anche se la vera causa è sconosciuta, i dati offerti dalla letteratura portano concordemente a ritenere che alla sua origine si possano rilevare almeno due diversi meccanismi (Barakat R.R. et al., 2000). Numerosi studi hanno infatti dimostrato differenze tra i carcinomi presenti in donne esposte all'azione degli estrogeni e quelli che si riscontrano in donne che non riferiscono una storia di esposizione ad un clima estrogenico non bilanciato dal progestinico. L'associazione tra un clima endocrino prevalentemente estrogenico, capace di determinare una iperstimolazione dell'endometrio ed un'aumentata incidenza di cancro dell'endometrio è stata

per la prima volta riportata circa 50 anni fa. Silverberg (Silverberg S.G. et al., 1980) ha dimostrato che le pazienti con carcinoma dell'endometrio presentano spesso minore parità, menopausa più tardiva, disturbi del ciclo mestruale, inoltre sono spesso obese, ipertese o affette da diabete mellito. Queste caratteristiche, oggi riconosciute come fattori di rischio costituzionali per il carcinoma dell'endometrio, hanno in comune la capacità di determinare un clima endocrino prevalentemente estrogenico. In queste donne l'iperstimolazione estrogeno indotta determina una serie di modificazioni dell'endometrio che iniziano con l'iperplasia per arrivare, attraverso una serie di ulteriori alterazioni dal potenziale sempre più maligno, alle manifestazioni tipiche del carcinoma endometriale.

Il primo tipo di carcinoma endometriale "estrogeno dipendente" è responsabile di oltre l'80% dei casi ed è spesso associato a iperplasia endometriale; viene diagnosticato nella maggior parte dei casi ad uno stadio precoce, è altamente o mediamente differenziato, ed ha più frequentemente una prognosi favorevole. Questi tumori esprimono spesso elevate percentuali di recettori per gli estrogeni e per il progesterone, e negli stadi avanzati, presentano una più elevata quota di risposta ai progestinici (Sivridis E. et al., 1998; Sherman M.E., 2000).

Come messo in evidenza fin dai primi anni '80 dai lavori pionieristici di Bokhman (Bokhman J.V., 1983), è possibile identificare un secondo tipo di

carcinoma endometriale, estrogeno indipendente, che origina da un endometrio atrofico, in donne anziane che non presentano i classici fattori di rischio. Il secondo tipo di carcinoma è più spesso scarsamente differenziato, tende ad invadere più profondamente il miometrio, ad interessare i linfonodi ed a metastatizzare a distanza; raramente esprime recettori per gli estrogeni ed il progesterone e risponde poco alle terapie ormonali. La sua prognosi è per lo più sfavorevole, rappresentando il 20-50% di tutti i carcinomi dell'endometrio. A queste due forme se ne è aggiunta una terza: carcinoma non endometriode associato ad endometrio atrofico (Sivridis E. et al., 1998). L'ipotesi dell'esistenza di questa terza forma di carcinoma dell'endometrio nasce dalla constatazione che la differenza in prognosi tra le due forme classiche di carcinoma dell'endometrio, potrebbe essere ridotta se non venissero considerati, nel gruppo originante da un endometrio atrofico, i tipi non endometrioidi del carcinoma endometriale, prevalentemente quelli a cellule chiare e quelli sierosi. Questi ultimi tipi non sono estrogeno dipendenti, hanno una prognosi estremamente sfavorevole e sembrano originare da un endometrio atrofico ma che contiene cellule marcatamente atipiche nell'epitelio superficiale (carcinoma intraepiteliale endometriale (EIC) o carcinoma in situ) (Ambros R.A. et al., 1995). Le donne con questi tipi di tumori non endometrioidi dell'endometrio hanno una minore incidenza di anomalie ovariche iperestrogeniche, sono meno frequentemente obese, non

presentano una storia nella quale figurò l'assunzione di estrogeni esogeni, contrariamente a quanto rilevabile nelle pazienti affette da carcinoma endometrioide, indipendentemente dall'origine di quest'ultimo da un endometrio iperplastico o da uno atrofico.

Un'attenta valutazione dell'utero effettuata dall'anatomo-patologo è essenziale per una diagnosi ed un trattamento idonei del cancro del corpo dell'utero. Il carcinoma dell'endometrio potrebbe prendere origine come una lesione focale distinta, come in un polipo endometriale. Inoltre, potrebbe essere diffusa in numerose aree differenti, interessando in alcuni casi tutta la superficie endometriale. L'adenocarcinoma, che rappresenta il tipo istologico più comune, è solitamente preceduto da una lesione predisponente. Solo le iperplasie con atipie cellulari sono considerate come precursori dell'adenocarcinoma dell'endometrio. I sottotipi istologici del carcinoma endometriale sono molteplici e riflettono le ampie possibilità di differenziazione della cellula ghiandolare di derivazione mulleriana. L'incidenza relativa dei vari istotipi varia nelle diverse casistiche, sia per differenze ambientali o genetiche sia per inevitabili difficoltà legate all'applicazione dei criteri classificativi. In linea di massima la classificazione più accettata è quella proposta dalla Società Internazionale dei Patologi Ginecologi che accanto ad un tipo endometrioide con le sue varianti, più comune, per lo più correlato all'iperestrogenismo, più frequente al di sotto

dei 60 anni, prevede una serie di altri istotipi che si sviluppano in prevalenza da cellule mulleriane pluripotenti per lo più in endometri atrofici ed in età più avanzata (Tabella 2).

- Adenocarcinoma endometriode
 - papillare villoghiandolare
 - secretorio
 - a cellule ciliate
 - con differenziazione squamosa
- Carcinoma mucinoso
- Carcinoma sieroso
- Carcinoma a cellule chiare
- Carcinoma indifferenziato
- Tipi misti
- Carcinomi miscellanei
- Carcinomi metastatici

Tabella 2

L'adenocarcinoma endometriale è il tipo istologico più frequente e lo si ritrova in circa il 75% dei casi. Si riscontra in forme ben differenziate, con ghiandole tubulari rivestite da cellule stratificate contenenti scarsa mucina. Nei casi più differenziati questa forma è distinguibile con difficoltà dall'iperplasia endometriale atipica avanzata. È frequente la presenza di aspetti papilliferi; quando questi sono evidenti, con papille corte e tozze, si realizza la variante papillifera o villoghiandolare. I caratteri di elevata differenziazione e la morfologia delle papille permettono di riconoscere questa variante a buona prognosi, distinguendola dal sottotipo

sierosopapillifero, a prognosi nettamente più sfavorevole. Nella variante secretiva nel citoplasma delle cellule sono presenti vacuoli ripieni di una sostanza ricca di glicogeno, simili a quelli che si riscontrano nelle cellule endometriali nella fase secretiva del ciclo mestruale. Questa variante è per lo più a prognosi favorevole, è particolarmente frequente nelle donne più giovani e va distinta dal carcinoma a cellule chiare, che ha una prognosi più infausta. La variante a cellule ciliate è piuttosto rara, per lo più rilevata in donne che hanno fatto uso in precedenza di estrogeni, a prognosi favorevole. La variante di adenocarcinoma endometriale con differenziazione squamosa non va confusa con il carcinoma endometriale a cellule squamose che rappresenta il 5% delle neoplasie endometriali ed è caratteristico dell'età senile. Quest'ultimo contiene elementi maligni sia di tipo ghiandolare che di tipo squamoso; la parete ghiandolare è di solito di tipo carcinoma endometrioide mentre la componente squamosa è chiaramente maligna ed infiltra lo stroma in maniera invasiva. Questi tumori hanno dal punto di vista clinico un comportamento aggressivo ed una prognosi sfavorevole. L'istotipo mucinoso deve contenere due elementi fondamentali: la presenza di cellule colonnari con nuclei orientati verso la base ed il rilievo di cellule disposte in maniera pseudostratificata. Gli elementi cellulari caratteristici (cellule ghiandolari con mucina intracitoplasmatica) devono rappresentare più del 50% del tumore. L'istotipo sierosopapillifero segue per frequenza

l'istotipo endometrioidale con le sue varianti, costituisce infatti il 10% del totale dei carcinomi endometriali e si riscontra soprattutto in età postmenopausale avanzata, in donne che non presentano un clima iperestrogenico, in genere magre, pluripare. Queste neoplasie presentano un'architettura papillifera con cellule tumorali che rivestono un ampio peduncolo vascolare. La neoplasia ha di solito aspetto vegetante e tende ad infiltrare precocemente il miometrio e ad invadere gli spazi linfovascolari, il che rende conto della loro prognosi estremamente sfavorevole. L'istotipo a cellule chiare è piuttosto raro. L'architettura è complessa con aspetti tubulocistici, solidi, papilliferi e ghiandolari. Molto frequenti sono particolari cellule, definite a "chiodo" per la posizione periferica del nucleo, spesso frammiste a cellule chiare contenenti abbondante glicogeno nel citoplasma. Queste neoplasie presentano un elevato grado di atipia e tendono ad invadere precocemente gli spazi linfovascolari per cui hanno una prognosi estremamente sfavorevole.

Il carcinoma squamoso è veramente raro: 31 casi descritti in letteratura. Caratteristico dell'età senile avanzata, dotato di malignità molto elevata, spesso associato con stenosi cervicale, piometra ed infiammazione cervicale, espressione forse di metaplasia squamosa tipica dell'epitelio cilindrico endocervicale, può essere diagnosticato soltanto escludendo la presenza di

una differenziazione ghiandolare presente nella variante adenosquamosa, o la diffusione endometriale di un carcinoma a cellule squamose della cervice.

L'istotipo indifferenziato comprende un piccolo gruppo di neoplasie la cui differenziazione è così scarsa da non consentire l'inquadramento in nessuno degli istotipi precedentemente descritti.

Metastasi nel corpo uterino di tumori primitivi di altre sedi sono rare. Si tratta per lo più di carcinomi primitivi della mammella o del tratto gastrointestinale. Tra gli organi genitali l'ovaio è quello che più frequentemente metastatizza al corpo dell'utero. In caso di compromissione simultanea dell'ovaio e dell'endometrio è piuttosto probabile che si tratta di molteplicità tumorale se le pazienti sono giovani o con tumore ben differenziato o poco infiltrante in sede ovarica o uterina.

Il sintomo di esordio è la perdita ematica atipica. In presenza di sanguinamento uterino in menopausa, nell'8-10% dei casi si tratta di carcinoma dell'endometrio. La precocità del sintomo fa sì che il 70% dei tumori endometriali siano diagnosticati quando la lesione è ancora al I stadio. Sfuggono le pazienti con stenosi serrata dell'orifizio uterino in cui la diagnosi può essere tardiva. Una percentuale variabile tra il 2,2 e il 3,1/1000 dei carcinomi dell'endometrio rimane per lungo tempo asintomatica; in questi casi la diagnosi è fortuita e viene effettuata su tumori occulti durante autopsie di donne morte per cause non legate alla patologia neoplastica (Horwitz R.I.

et al., 1981). Una diagnosi precoce e quindi un adeguato trattamento della neoplasia rappresenta la migliore prevenzione dello sviluppo di forme più invasive di carcinoma dell'endometrio. Uno screening di massa non è di nessun provato vantaggio ed è economicamente improponibile. La diagnosi citologica di cancro dell'endometrio con il Pap test è generalmente mediocre rispetto alla diagnosi di neoplasia cervicale iniziale. Il riscontro di cellule endometriali normali in Pap test in donne in postmenopausa è nella maggioranza dei casi senza significato clinico, nel 6% dei casi può essere associato a carcinoma, nel 13% ad iperplasia. Il riscontro di cellule endometriali atipiche è indice di neoplasia in circa il 25% dei casi.

Secondo l'American College of Obstetricians and Gynecologists allo stato attuale, non esistono indagini non invasive sufficientemente sensibili e specifiche da utilizzare per lo screening e la diagnosi di pazienti con carcinoma endometriale asintomatico; è possibile, invece, identificare una popolazione maggiormente a rischio da sottoporre a prevenzione secondaria. Fortunatamente, il riscontro in oltre l'80% dei casi di un sanguinamento anomalo o di una leucorrea persistente, permette che la neoplasia venga diagnosticata in uno stadio precoce, cui sono associati un alto indice di curabilità ed una sopravvivenza a 5 anni di circa il 75%. Sintomi di esordio meno frequenti sono disuria, stranguria e dispareunia; dolore pelvico, ematometra o piometra, correlati a stenosi cervicale e calo ponderale

inspiegato, compaiono di solito in pazienti più anziane o in stadi più avanzati della neoplasia, e sono associati ad una prognosi sfavorevole.

Il sanguinamento vaginale anomalo in età peri o postmenopausale, in presenza di fattori di rischio per il tumore, andrebbe immediatamente indagato con una valutazione ecografica ed istologica dell'endometrio. L'ecografia transvaginale consente uno studio più accurato della struttura e dello spessore endometriale. In post menopausa l'endometrio è atrofico, il rilievo di un endometrio ispessito può essere riscontrato in presenza di polipi, iperplasia endometriale e carcinomi del corpo dell'utero. I segni ultrasonografici deponenti per l'adenocarcinoma sono la perdita di omogeneità dell'endometrio, la sua vacuolizzazione, la scomparsa o interruzione dell'alone periendometriale. Se lo spessore dell'endometrio è < 4 mm il rischio di iperplasia endometriale è minimo e non dovrebbero essere praticate indagini invasive (Tabella 3).

- Mestruale 1-4 mm
- Proliferativa 4-8 mm
- Secretoria 7-14 mm
- Post-menopausale 4-8 mm
- Post menopausale in terapia sostitutiva fino a 10 mm

Tabella 3

Il rischio di falsi negativi, in base a questo limite, è inferiore all'1%. Fino ad oggi però, non esiste un accordo generale della misura di cut-off al di sotto del quale non è necessario eseguire una biopsia endometriale. Costituisce un limite a questa metodica il fatto che il carcinoma endometriale non estrogeno dipendente non si sviluppa da un'iperplasia, bensì su di un endometrio atrofico, ecograficamente non ispessito. Attualmente si ritiene che l'isteroscopia costituisca il Gold Standard nella diagnosi del carcinoma dell'endometrio, in quanto permette una visione completa sia del canale cervicale che della cavità uterina e permette di valutare la topografia e l'estensione della lesione, quindi la visualizzazione di lesioni focali che con il raschiamento frazionato potrebbero sfuggire. La biopsia endometriale, previa isteroscopia, è attualmente la metodica più idonea e permette di valutare l'eventuale interessamento del canale cervicale. Il materiale asportato dovrebbe consentire l'identificazione di fattori prognostici, quali il grading e l'istotipo, tali da permettere la programmazione del più idoneo approccio chirurgico. Molti degli esami radiologici utilizzati nella diagnostica di questo tumore quali l'urografia, il clisma opaco, la linfografia sono stati soppiantati dalle nuove metodiche ed in particolare dalla RMN. La valutazione preoperatoria dell'infiltrazione miometriale, dell'invasione cervicale e dell'eventuale interessamento linfonodale nel carcinoma endometriale svolge un ruolo importante per un corretto approccio chirurgico. La RMN si è

dimostrata molto affidabile; al contrario la TC non sembra mostrare la stessa affidabilità nella valutazione dell'infiltrazione miometriale, in particolare nelle pazienti più anziane con il miometrio atrofico (Dore R. et al., 1987).

Non disponiamo di marcatori tumorali trasferibili nella pratica clinica che ci consentano una diagnosi precoce. I livelli del CA 125 sierico sembrano essere significativamente elevati in pazienti con linfonodi positivi o infiltrazione miometriale profonda. Nel follow-up un aumento di tale marcatore potrebbe essere indice di ripresa della malattia in particolare negli istotipi sierosi papilliferi. Tuttavia livelli elevati di CA 125 possono riscontrarsi anche in pazienti sottoposte a radioterapia senza presenza di recidive (Sato K. et al., 1994; Scambia G. et al., 1994).

Una volta stabilita la diagnosi di carcinoma endometriale, è necessario che la paziente sia sottoposta ad una serie di indagini che garantiscano un'adeguata stadiazione clinica della neoplasia e, conseguentemente, una programmazione terapeutica ottimale (Tabella4).

Valutazione Medica Pre-Trattamento

- Visita ginecologica vaginale e rettale
- Ecografia transvaginale
- Ecografia epatica e renale
- Microcolpoisteroscopia-isteroscopia
- Radiografia del torace
- RMN pelvi

Indagini opzionali

- Urografia
- Rettocolonscopia
- Clisma opaco a doppio contrasto
- Laparoscopia
- Cistoscopia
- Scintigrafia epatica
- Scintigrafia scheletrica

Tabella 4

La valutazione clinica rimane importante per lo studio preoperatorio della paziente. Il raschiamento frazionato con isteroscopia è raccomandato per la valutazione preliminare di possibile diffusione cervicale. Secondo le raccomandazioni FIGO obbligatoria risulta essere solo la radiografia del torace. Altri esami di imaging sono suggeriti su particolari indicazioni cliniche di sospetto di malattia metastatica (RMN). Anche la cistoscopia e la rettoscopia non sono obbligatorie ma indicate sulla guida di sintomi o segni clinici.

Le decisioni definitive riguardo al protocollo terapeutico da adottare dipendono, comunque, da una molteplicità di fattori individuali, tra i quali lo stato generale della paziente, l'età al momento della diagnosi, ma

soprattutto lo stadio chirurgico della neoplasia determinato secondo la classificazione della “International Federation of Gynecology and Obstetrics” (FIGO), in base alla valutazione macroscopica ed istopatologica intraoperatoria del tumore (Mikut J.J., 1993; FIGO, 1988) (Tabella 5).

1998, Stadiazione chirurgica FIGO per il cancro dell'endometrio
<u>Stadi I Il carcinoma è limitato al corpo dell'utero incluso l'istmo.</u> Stadio IA G1,2,3 Tumore limitato all'endometrio Stadio IB G1,2,3 Tumore con invasione miometriale <50% Stadio IC G1,2,3 Tumore con invasione miometriale >50%
<u>Stadio II Il carcinoma ha coinvolto la cervice ma non è esteso fuori dall'utero.</u> Stadio IIA G1,2,3 Estensione al canale cervicale solo mucosa Stadio IIB G1,2,3 Estensione al tessuto stromale cervicale
<u>Stadio III Il carcinoma è esteso fuori dall'utero ma confinato alla pelvi.</u> Stadio IIIA G1,2,3 Estensione alla sierosa uterina, agli annessi e/o citologia peritoneale positiva Stadio IIIB G1,2,3 Metastasi o estensione vaginale
<u>Stadio IV Il carcinoma ha interessato la mucosa della vescica e del retto o presenza di metastasi a distanza.</u> Stadio IVA G1,2,3 Invasione della mucosa vescicale e rettale Stadio IVB G1,2,3 Metastasi a distanza incluse le metastasi peritoneali e ai linfonodi inguinali

Tabella 5

L'esame patologico sul pezzo operatorio consente di identificare i fattori di prognosi più importanti che caratterizzano le pazienti ad alto rischio di recidiva, che necessitano pertanto di maggiore radicalità chirurgica e di eventuale terapia adiuvante. La prognosi del carcinoma dell'endometrio è direttamente correlata alla presenza o assenza di fattori di rischio intrauterini (istotipo, grading, invasione miometriale, estensione all'istmo

ed alla cervice, invasione degli spazi linfovaskolari) e/o extrauterini (metastasi agli annessi, diffusione intraperitoneale, citologia peritoneale positiva, metastasi linfonodali pelviche e para-aortiche).

Nell'ambito dei fattori di rischio intrauterini quello maggiormente correlato alla sopravvivenza ed al fallimento del trattamento sembra essere l'infiltrazione miometriale, strettamente correlata al grado di differenziazione istologica. Molti studi hanno confermato che, con il ridursi del grado di differenziazione del tumore, si assiste ad una maggiore tendenza all'invasione miometriale profonda e, conseguentemente, ad una più alta percentuale di coinvolgimento linfonodale pelvico e para-aortico e ad una diminuzione della percentuale di sopravvivenza a 5 anni.

L'adenocarcinoma endometriale, il tipo istologico più frequente, ha in genere una prognosi favorevole. La sua aggressività è correlata solamente al grado di differenziazione. I tipi istologici che invece, indipendentemente dal grado, non hanno una prognosi favorevole sono il carcinoma sieroso-papillifero, il carcinoma a cellule chiare, il carcinoma indifferenziato, il carcinoma squamoso.

Il grado di differenziazione istologica del cancro dell'endometrio è stato per molto tempo accettato come uno dei più sensibili indicatori della prognosi. Quando il tumore perde la sua differenziazione, le probabilità di sopravvivenza diminuiscono. Quando il tumore diventa meno

differenziato, aumentano le probabilità di interessamento miometriale profondo. Circa il 50% delle lesioni G3 presenta una infiltrazione della metà esterna dello spessore miometriale, con interessamento linfonodale pelvico nel 34% e paraortico nel 23% dei casi. Esistono tuttavia delle eccezioni. La valutazione citologica del fluido peritoneale, o washing, è stata riconosciuta un importante fattore nella prognosi e nella stadiazione delle neoplasie maligne della pelvi. La presenza di cellule maligne nel fluido peritoneale tende a neutralizzare i fattori prognostici favorevoli ed i risultati citologici acquisiscono una considerazione molto importante. Sembra che la presenza di cellule maligne rappresenti un importante fattore prognostico anche quando la malattia è limitata all'utero. Tutti questi fattori prognostici clinicopatologici, pur conservando un indiscutibile, primario ruolo nella valutazione terapeutica e prognostica di pazienti affette da cancro dell'endometrio, si sono dimostrati scarsamente accurati e/o riproducibili, oltre che difficilmente valutabili in fase diagnostica pre-trattamento, e appaiono pertanto, inadatti alle esigenze moderne.

Fortunatamente, i recenti progressi nel campo della biologia molecolare hanno promosso, e continuano a promuovere, una valutazione prognostica integrata, nella quale, accanto ai fattori clinicopatologici tradizionali, trovano posto nuovi parametri biomolecolari, la cui analisi è oggettiva, riproducibile e, richiede un esiguo prelievo di tessuto tumorale (Tabella 6).

Fattori prognostici biomolecolari nel carcinoma endometriale

1. Recettori ormonali steroidei
2. Oncogeni
 - Ras, HER-2/neu (c-erb B2)
 - Fattori di crescita e recettori specifici (EGF, TGF- α , IGF-1, EGFR)
- 3. Oncosoppressori**
 - p-53
 - PTEN
 - DAA mismatch repair genes (h-MLH1)
4. Antigeni correlati al ciclo cellulare
 - PCNA
 - Ki 67 Inibitori delle CDK
 - DNA polimerasi- α
 - Cicline
5. Proteine correlate all'apoptosi
 - bcl-2
 - BAX
6. Densità microvascolare
7. Analisi della DNA ploidia
8. Molecole associate ad invasione stromale e metastatizzazione

Tabella 6

Presupposto razionale ad una valutazione prognostica biomolecolare è il concetto che, l'acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di un fenotipo maligno (crescita eccessiva, invasività locale, metastatizzazione), avvenga attraverso un processo "multistep" (Alberts B. et al., 1994), cui corrisponderebbe, a livello molecolare, un progressivo accumulo di "hits", cioè di lesioni a carico di geni importanti per il controllo della crescita, per l'angiogenesi, per i processi di invasione e di metastatizzazione tumorale (Berchuck A. et al., 1995).

Il decorso clinico del cancro dell'endometrio sembrerebbe correlarsi qualitativa e quantitativamente alle alterazioni biomolecolari presenti in ogni sua singola cellula; viceversa, la valutazione e la caratterizzazione di specifici pattern di anomalie genetiche, cromosomiche o bioumorali, dovrebbe poter predire il comportamento biologico del tumore e perciò il destino della paziente.

La determinazione del contenuto di recettori ormonali estrogenici (ER) e progestinici (PR) nel tessuto tumorale, ha rappresentato, il primo tentativo di caratterizzare l'aggressività del carcinoma endometriale da un punto di vista biologico (Utaaker E. et al., 1987). Gli steroidi gonadici, interagendo con recettori specifici presenti a livello dell'epitelio e dello stroma endometriale, giocano un ruolo essenziale nel controllo della crescita e del differenziamento cellulare. E' stato infatti dimostrato che, tumori positivi alla ricerca di recettori per estrogeni e progestinici presentano un grado istologico, uno stadio e quindi una prognosi più favorevole (Ehrlich C.E. et al., 1988). Recentemente è stata proposta da alcuni Autori l'analisi del ruolo prognostico che alterazioni a carico dei principali bersagli del danno genetico neoplastico, cioè oncogeni e geni soppressori tumorali, rivestono nel carcinoma dell'endometrio.

Gli oncogeni derivano dalla mutazione dominante di loci che controllano importanti funzioni cellulari (proto-oncogeni) e che, in virtù di questa

alterazione, acquisiscono la proprietà di produrre segnali anomali, responsabili di una proliferazione e di un differenziamento cellulare altrettanto anomalo.

Alcune fra le mutazioni oncogenetiche più frequentemente registrate nei carcinomi endometriali (Bamberger A.M. et al., 1998), sembrano associarsi significativamente a fattori prognostici negativi e sono state, pertanto, proposte quali parametri addizionali predittivi di una prognosi infausta. È stato dimostrato, per esempio, che l'amplificazione e l'overespressione di HER-2/neu (c-erb B-2), oncogene codificante per un recettore di membrana implicato nella trasduzione del segnale mitogeno, tende ad associarsi ad uno stadio avanzato e ad una bassa concentrazione di recettori progestinici (Wang D. et al., 1993).

L'attivazione di K-ras, oncogene appartenente ad una famiglia di proteine ad attività GTPasica coinvolte nella trasduzione intracellulare del segnale proliferativo, rappresenterebbe, invece, un evento estremamente precoce nella cancerogenesi endometriale (Duggan B.D. et al., 1994) ed è capace di predire una evoluzione sfavorevole del tumore (Mizuuchi H. et al., 1992).

Fra gli oncogeni, vanno ricordati, infine, anche numerosi fattori di crescita polipeptidici, implicati nella regolazione autocrina e paracrina della proliferazione endometriale, per i quali è stato proposto un importante ruolo patogenetico e prognostico nel cancro dell'endometrio (Murphy L.J.

et al., 1991). Mutazioni di geni che codificano per fattori di crescita o per i loro recettori specifici, potrebbero rendere questi geni “oncogenetici”, innescando una proliferazione cellulare accelerata, fortemente a rischio per l'insorgenza di nuove mutazioni spontanee (Pustztai L. et al., 1993).

Gli oncosoppressori sono, invece, geni codificanti per proteine variamente dislocate lungo le vie di trasduzione di segnali antiproliferativi. Pur avendo un'azione opposta a quella dei proto-oncogeni, quando colpiti da mutazioni recessive inattivanti, questi geni inducono una crescita cellulare afinalistica e deregolata. Per alcuni oncosoppressori, è stato ipotizzato un qualche ruolo predittivo del comportamento biologico del carcinoma endometriale (Jacks T. et al., 1996; Lax S.F. et al., 1998; Pisani A.L. et al., 1995).

La perdita omozigote o la mutazione dell'oncosoppressore p53, proteina nucleare coinvolta nei meccanismi di risposta cellulare allo stress citotossico, è stata, ad esempio, associata ad istotipi aggressivi, a neoplasie in stadio avanzato e ad una ridotta sopravvivenza globale.

Controverso resta, invece, il ruolo prognostico ipotizzato per alterazioni a carico dell'oncosoppressore PTEN (MMAC1), gene implicato nel controllo dell'adesione focale, della migrazione (Tamura M. et al., 1998) e della proliferazione delle cellule neoplastiche (Matsushima-Nishiu M. et al., 2001). In contrasto con i numerosi studi che correlano queste anomalie geniche ad uno stadio avanzato di malattia (Steck P.A. et al., 1997) e ad

instabilità microsatellitare (Salvesen H.B. et al., 2001), uno studio associa l'inattivazione di PTEN a fattori prognostici favorevoli, quali un istotipo benigno e l'assenza di metastasi (Risinger J.I. et al., 1998). Altrettanto conflittuali restano gli studi che ipotizzano un ruolo prognostico nel cancro dell'endometrio per "l'instabilità microsatellitare" (Caduff R.F. et al., 1996; MacDonald N.D. et al., 2000), condizione caratterizzata da multipli errori nella replicazione di sequenze geniche ripetute, relativi a mutazioni geniche o epigenetiche a carico di un'altra categoria di oncosoppressori, noti come "DNA mismatch repair genes", cioè geni addetti alla regolazione dei processi di riparazione del danno al DNA. Anomalie a carico di questi geni influenzano, indirettamente, la carcinogenesi, interferendo con la capacità dell'organismo di riparare danni genetici non letali e determinando così l'accumulo di mutazioni predisponenti alla trasformazione neoplastica. Dati riguardanti la cinetica delle cellule tumorali stanno emergendo quali importanti parametri di valutazione nella caratterizzazione prognostica del carcinoma endometriale (van Diest P.J. et al., 1998). L'abnorme capacità di accrescimento che caratterizza, fenotipicamente, le neoplasie maligne, è determinata da un'alterazione di quell'equilibrio fra proliferazione e perdita di cellule, che è alla base del mantenimento dell'omeostasi tissutale.

Indici proliferativi come la stima citoflussimetrica della frazione di cellule tumorali impegnate nella sintesi nucleotidica (S-phase fraction) (Salvesen

H.B. et al., 1998) o le metodiche immunohistochimiche, che rilevano nell'espressione di antigeni correlati al ciclo cellulare alterazioni indicative della capacità proliferativa del tumore (van Diest P.J. et al., 1998), sembrano significativamente associati ai tradizionali fattori prognostici clinicopatologici per il carcinoma dell'endometrio (Salvesen H.B. et al., 1998).

Controversa, resta invece l'ipotesi che l'attivazione di oncogeni implicati nei segnali di sopravvivenza (Bcl-2) (Saegusa M. et al., 1997; Peiro G. et al., 2003) o la ridotta espressione di fattori pro-apoptotici (Bax), possano essere realmente predittivi di un comportamento biologico aggressivo della neoplasia (Chheng D.C. et al., 1996; Miturski R. et al., 1998).

Degna di nota, per quanto ancora in fase precoce di analisi, è la possibilità che fattori bioumorali e molecolari implicati in tappe cruciali della progressione tumorale, quali la neoangiogenesi, l'invasione stromale e la metastatizzazione, possano rappresentare dei nuovi, addizionali parametri di valutazione nella caratterizzazione prognostica del tumore.

Numerosi sono gli studi che documentano una correlazione positiva fra “densità microvascolare e/o macrofagica”, stadio, tasso di recidiva e prognosi infausta nel carcinoma endometriale (Salvesen H.B. et al., 1998).

Interessanti appaiono gli studi che valutano alterazioni nell'espressione di enzimi proteolitici (catepsina D) (Maudelonde T. et al., 1990), componenti

della membrana basale (laminine) (Vogel H.P. et al., 1987) e proteine della matrice extracellulare (E-caderine) (Inoue M. et al., 1992), quali parametri predittivi di fenomeni prognosticamente sfavorevoli come l'invasione stromale, la migrazione e l'impianto a distanza di cellule tumorali.

L'analisi quantitativa del contenuto in DNA ("DNA ploidia") delle cellule neoplastiche rappresenta un ulteriore strumento per la caratterizzazione prognostica del cancro dell'endometrio (Iversen O.E. et al., 1988) e di molte altre neoplasie solide (Ellis C.N. et al., 1991).

Anomalie nel controllo della proliferazione cellulare determinerebbero, in circa un terzo dei carcinomi endometriali, l'instaurarsi di una condizione di "instabilità", caratterizzata, a livello molecolare, da aberrazioni cromosomiche numeriche e/o strutturali, predittive, a livello fenotipico, di una precoce acquisizione di caratteri di malignità (Von Minckwitz G. et al., 1994). Numerosi studi hanno confermato l'impatto prognostico negativo esercitato da un contenuto aneuploide di DNA tumorale, riportandone una significativa associazione con parametri tradizionalmente predittivi di una prognosi sfavorevole, quali, un istotipo aggressivo, un alto indice di recidiva ed una bassa sopravvivenza globale (Jacobsen M. et al., 1997). Non mancano, tuttavia, in letteratura, studi che giungono a risultati del tutto contrastanti (Jhala D.N. et al., 2001), lasciando da chiarire il reale

valore patogenetico e prognostico della presenza e del tipo di aneuploidia nel carcinoma dell'endometrio.

Il Sistema degli Endocannabinoidi

Il nome del sistema endocannabinoide deriva da una pianta di origine antichissima la cannabis o pianta della canapa, che è una delle piante psicoattive note all'umanità da più lungo tempo.

In botanica è classificata come un membro della famiglia Cannabaceae. Il suo nome di origine scitica è *Cannabis sativa* ed è presente in America ed Europa. Ne esistono altre due varianti: *indica* (Asia) e *ruderalis* (Siberia-Russa). La *Cannabis sativa* è una specie dioica in quanto genera piante con fiori maschili e fiori femminili. Recentemente, alcuni botanici hanno definito la *Cannabis sativa* come un'unica specie con buone caratteristiche di adattabilità ai differenti climi e suoli. Probabilmente originaria dell'Asia centro-orientale, è stata coltivata fin dai tempi più remoti; resti di corde di canapa risalenti a circa diecimila anni fa sono stati trovati in un sito archeologico dell'isola di Taiwan. Anche i suoi usi medici si perdono nella notte dei tempi (Walton et al., 1975).

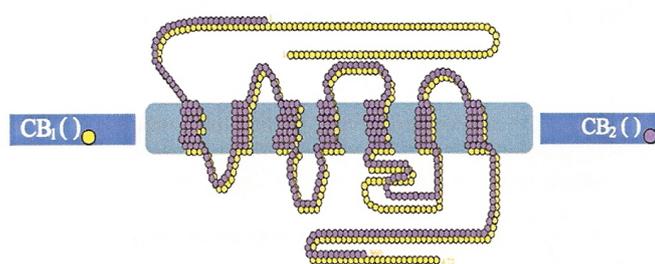
I composti chimici responsabili degli effetti psicotropi e medicinali si trovano principalmente in una resina dorata e appiccicosa, essudato dai fiori della pianta femminile. Si pensa che la resina abbia una funzione di protezione dal calore e di conservazione dell'umidità durante la riproduzione.

Nella *Cannabis sativa* sono stati identificati più di 400 costituenti differenti, oltre 60 dei quali appartengono alla famiglia dei cannabinoidi (acido

cannabico, cannabinolo, cannabidiolo), composti che hanno in comune una particolare struttura a 21 atomi di carbonio (Di Marzo et al., 2002); tra questi il maggior componente psicoattivo il Δ^9 - tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) fu identificato nel 1964 da un chimico israeliano (Mechoulam et al, 1986). Successivamente, studi condotti sulle relazioni esistenti tra la struttura chimica e l'attività farmacologica del Δ^9 - THC hanno dimostrato che l'enantiomero sintetico (+)- Δ^9 -THC, che differisce dall'isomero naturale (-)- Δ^9 THC per la configurazione di uno dei centri chirali, era molto meno attivo. Questo dimostrava che l'attività del (- Δ^9)- – THC era dipendente da caratteristiche strutturali come la presenza di centri chirali con una determinata configurazione enantiomerica. Per ventiquattro anni l'opinione prevalente tra farmacologi e neurobiologi era che una sostanza lipofila come il Δ^9 -THC, non potesse agire come la morfina ma, piuttosto, che si “sciogliesse” nella matrice lipidica della membrana e ne modificasse in maniera non selettiva le proprietà biochimiche (Bach et al., 1976). Fino a pochi anni fa, si interpretavano gli effetti del Δ^9 -THC in base alla sua lipofilità ed alla conseguente capacità di interagire aspecificamente con le membrane cellulari alterando la struttura e quindi, la funzionalità delle proteine di membrana (Makriyannis et al., 1995). Solo recentemente si sono ottenuti dati sufficienti a dimostrare che molti effetti dei cannabinoidi sono mediati da specifiche proteine recettoriali presenti a livello del sistema

nervoso centrale (SNC) ed in periferia. La conclusione è stata che l'azione dei cannabinoidi era altamente stereoselettiva e di conseguenza che le membrane cellulari, mancando di tale stereospecificità, non potevano essere il principale bersaglio d'azione di queste sostanze.

L'ipotesi che gli effetti del Δ^9 -THC fossero dovuti al legame con specifici recettori e non ad una perturbazione della membrana lipidica, fu confermata nel 1990, quando Mastuda e collaboratori clonarono il recettore CB1 (Mastuda et al., 1990) nel cervello del topo. Tre anni dopo, usando le omologie di sequenza, fu identificato il recettore CB2 (Munro et al., 1993) che è stato clonato da una libreria di cDNA di particolari cellule umane leucemiche (HL60) (Figura 1). Sembrano esistere altre proteine appartenenti alla famiglia dei recettori dei cannabinoidi, classificate come non-CB1, non-CB2, ma non essendo stato ancora clonato la sua esistenza è ancora considerata ipotetica (Di Marzo et al., 2000; Breivogel et al., 2001).



Identità complessiva = 44%
Identità Transmembrana = 68%

Fig.1

I recettori CB1 e CB2 fanno parte della famiglia dei recettori accoppiati a proteine G caratterizzati dalla presenza di sette domini trans-membrana.

Il recettore CB2 presenta una identità di membrana del 68% e una identità complessiva del 44% con il recettore CB1. Il secondo ed il terzo “loops” intracellulari sembrano essere, insieme al dominio C-terminale, i domini maggiormente coinvolti nella selettiva interazione con le G-proteine di tipo Gi e G0. Sembra che il CB2 si leghi preferenzialmente al tipo Gi (Glass e Northup, 1999).

L'attivazione dei recettori per i cannabinoidi porta:

1. all'inibizione dell'adenilato ciclasi, con la conseguente diminuzione dei livelli di cAMP (Felder et al., 1995),
2. all'attivazione delle proteine chinasi mitogeno attivate (MAPK) (Bouabula et al., 1995);
3. all'espressione di geni come krox-24 (Bouabula et al., 1995).

Gli effetti cellulari indotti “esclusivamente” dal recettore CB1 sono:

1. l'inibizione dei canali del calcio di tipo N e P/Q (Felder et al., 1995; McAllister et al., 1999);
2. l'attivazione dei canali del potassio di tipo A (Mackie et al., 1992; Pertewee et al., 1997).

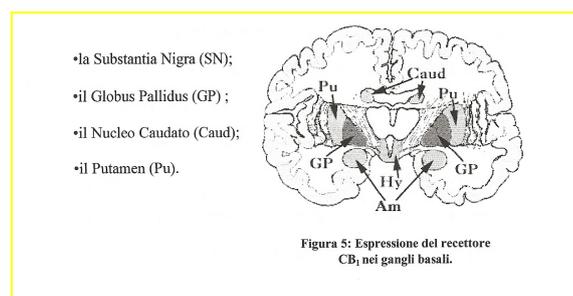
I recettori dei cannabinoidi possono essere accoppiati a diverse G-proteine o a diversi secondi messaggeri nei differenti tessuti, e gli endocannabinoidi

possono attivare preferenzialmente un tipo di proteina G inducendo in questo modo distinti effetti fisiologici (Howlett et al., 1999).

Data l'alta distribuzione a livello del SNC, il recettore CB1 era considerato come il recettore dei cannabinoidi centrale, mentre il recettore CB2, maggiormente espresso nel sistema immunitario, come la sua "controparte periferica". Questa classificazione fu ben presto rivista in seguito a successivi studi che dimostrarono l'esistenza del recettore CB1 anche in tessuti periferici e la presenza del recettore CB2 in cellule immuni derivanti dal cervello (Porter et al., 2001).

Il recettore CB1 nel cervello mostra la maggiore espressione nell'ippocampo ed in particolare nella regione CA3 del giro dentato, e nei gangli basali. Il recettore CB1 è ben rappresentato anche nel cervelletto (Cer), la parte del sistema nervoso che controlla l'equilibrio e la coordinazione dei movimenti volontari.

Le regioni principali alle quali i cannabinoidi si legano preferenzialmente sono i cosiddetti gangli basali. Si tratta di centri preposti al controllo della motilità involontaria (Figura 5).



Essi comprendono:

- la Substantia Nigra (SN);
- il Globus Pallidus (GP);
- il Nucleo Caudato (Caud);
- il Putamen (Pu).

Un'altra area ricca di recettori per i cannabinoidi è il cosiddetto sistema limbico (Dove Pettit et al., 1998; Hohmann et al., 1999). Quest'ultimo è coinvolto nei processi di memorizzazione e nel controllo di stati emozionali quali la rabbia, il desiderio e la paura.

Il sistema limbico è composto da:

- Ippocampo, sede di importanti processi legati alla memoria;
- Amigdala, area coinvolta nel controllo degli stati emozionali;
- Ipotalamo, area che svolge funzioni di controllo neuroendocrino.

Una moderata espressione di CB1 è presente nella corteccia, ma anche nell'ipotalamo, nell'amigdala, nelle corna dorsali, nella spina dorsale (Bidaut-Russell et al., 1990) e nel bulbo olfattorio (Dove Pettit et al., 1998).

Una bassa densità di espressione di CB1 è presente nella medulla e nel talamo (Felder et al., 1996; Dove Pettit et al., 1998). Esiste una bassa densità di recettori per i cannabinoidi anche in varie aree della corteccia cerebrale.

L'espressione del recettore CB1 non è ristretta al sistema nervoso centrale.

Anche i neuroni enterici presentano il recettore CB1, probabilmente responsabile degli effetti antiemetici, anti-secretori e anti-motori del Δ^9 – THC nell'intestino tenue (Izzo et al., 2001). Il recettore CB1 è stato individuato anche negli occhi (Porcella et al., 2000), nell'utero (Das et al., 1995), nei testicoli (Gerard et al., 1991), nella vescica urinaria (Martin et al., 2000), nel cuore (Ishac et al., 1996), nel polmone (Rice et al., 1997), nel timo, nel fegato (Schatz et al., 1997), e nelle cellule immunitarie (Klein et al., 1998; Matias et al., 2002).

Il recettore CB2 sembra essere ristretto alle cellule del sistema immunitario (Munro et al., 1993). Esso è espresso nelle tonsille, in zone marginali della milza, nelle cellule immunitarie, come, le cellule B e T e le natural killer, nei monociti, e nelle cellule dendritiche (Klein et al., 1998; Matias et al., 2002).

Le molecole endogene, note allo stato attuale, capaci di legare i recettori dei cannabinoidi in maniera selettiva, sono derivati dall'acido arachidonico con 20-22 atomi di carbonio e da tre a cinque doppi legami: anandamide, 2-arachidonilglicerolo, noladin etere, N-Arachidonildopamina, virodamina.

L'Anandamide (AEA), dal sanscrito ananda per “stato di grazia”, si comporta come un agonista parziale e un agonista debole, rispettivamente, nei confronti dei recettori CB1 e CB2. E' più selettiva nei confronti del recettore CB1 che del recettore CB2 (Burkey et al., 1997). Nel cervello è presente nell'ippocampo (Felder et al., 1996; Bisogno et al., 1999), nella corteccia,

nella medulla (Bisogno et al., 1999), nel cervelletto, nel talamo (Felder et al., 1996), ma anche nel circuito limbico, nello striato, nel diencefalo, nel mesencefalo (Bisogno et al., 1999), nella ghiandola pituitaria (Pagotto et al., 2001), nella sostanza nera e nel globo pallido (Di Marzo et al., 2000). L'AEA è presente anche in tessuti periferici come la retina (Bisogno et al., 1999), il cuore (Felder et al., 1996; Koga et al., 1997), la milza (Felder et al., 1996), il fegato, i reni, il timo, i testicoli (Koga et al., 1997), l'utero (Burkey et al., 1997), la pelle e numerose cellule immunitarie (Klein et al., 1998; Parolaro et al., 1998; Matias et al., 2002).

Il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) può legare con la stessa affinità i due tipi di recettori, risulta essere 50-500 volte più abbondante dell'AEA. Nel SNC è presente nel cervello (Sugiura et al., 1995), mentre in periferia si trova nell'intestino (Mechoulam et al., 1995), nel fegato, nella milza, nei polmoni, nei reni, nei testicoli e nella retina (Kondo et al., 1998). Il 2-AG, come AEA, è ubiquitario nel cervello (Bisogno et al., 1999), ma è anche presente nel plasma (Kondo et al., 1998) ed in numerose cellule immunitarie (Klein et al., 1998; Matias et al., 2002).

Noladin etere lega il recettore CB1 e molto debolmente il recettore CB2 (Hanus et al., 2001), è presente nel SNC e, in particolare, nel talamo, nell'ippocampo, nel cervelletto e nella spina dorsale (Fezza et al., 2001).

Virodhamine (Porter et al., 2002), dal sanscrito virodha che significa “opposto”, presenta una struttura opposta all’AEA. E’ un agonista pieno del recettore CB2, è presente nel SNC, in particolare nell’ippocampo, nella corteccia e nel cervelletto. E’ interessante notare che è espressa in alte concentrazioni in tessuti periferici, inclusi milza, fegato, reni, tessuti che presentano anche un’altissima espressione del recettore CB2 (Huang et al., 2002).

N-Arachidonildopamine (NADA) è un ammido tra l’acido arachidonico e la dopamina. E’ un agonista del recettore CB1, è presente nel SNC, in particolare nello striato, nell’ippocampo e nel cervelletto.

Gli endocannabinoidi sono considerati come neuromodulatori locali, rilasciati dalla cellula “a richiesta”, in seguito all’ingresso di calcio nella cellula e sintetizzati a partire da precursori fosfolipidici, ricavati dalle membrane lipidiche.

La biosintesi dell’Anandamide vede il coinvolgimento di due enzimi calcio-dipendenti: il primo la NAPE-PLD (N-Arachidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi di tipo D) è stato purificato, caratterizzato (Hansen et al., 1999; Ueda et al., 2001) e clonato (Okamoto et al., 2004). È un membro della famiglia delle zinco metallo idrolasi, abbondante nel cervello, nei reni e nei testicoli. La NAPE-PLD è responsabile della reazione di idrolisi del N-arachidonil-fosfatidil-etanolamina (NArPE), che produce AEA ed acido

fosfatidico. Lo stesso enzima è, anche, responsabile della formazione dell’N-palmitoil-etanolamina, dal corrispondente precursore fosfolipidico.

Il NArPE, precursore dell’AEA, è prodotto per N-acilazione della fosfatiletanolamina (PE) con acido arachidonico, nella posizione sn-1 del fosfolipide donatore (sn-1,2-di-arachidonil-fosfatidilcolina). Questa reazione è catalizzata dal secondo enzima: l’N-acil-transferasi (NAT). L’attività delle NAT è controllata da due secondi messaggeri: calcio e AMP ciclico (Fig.3)

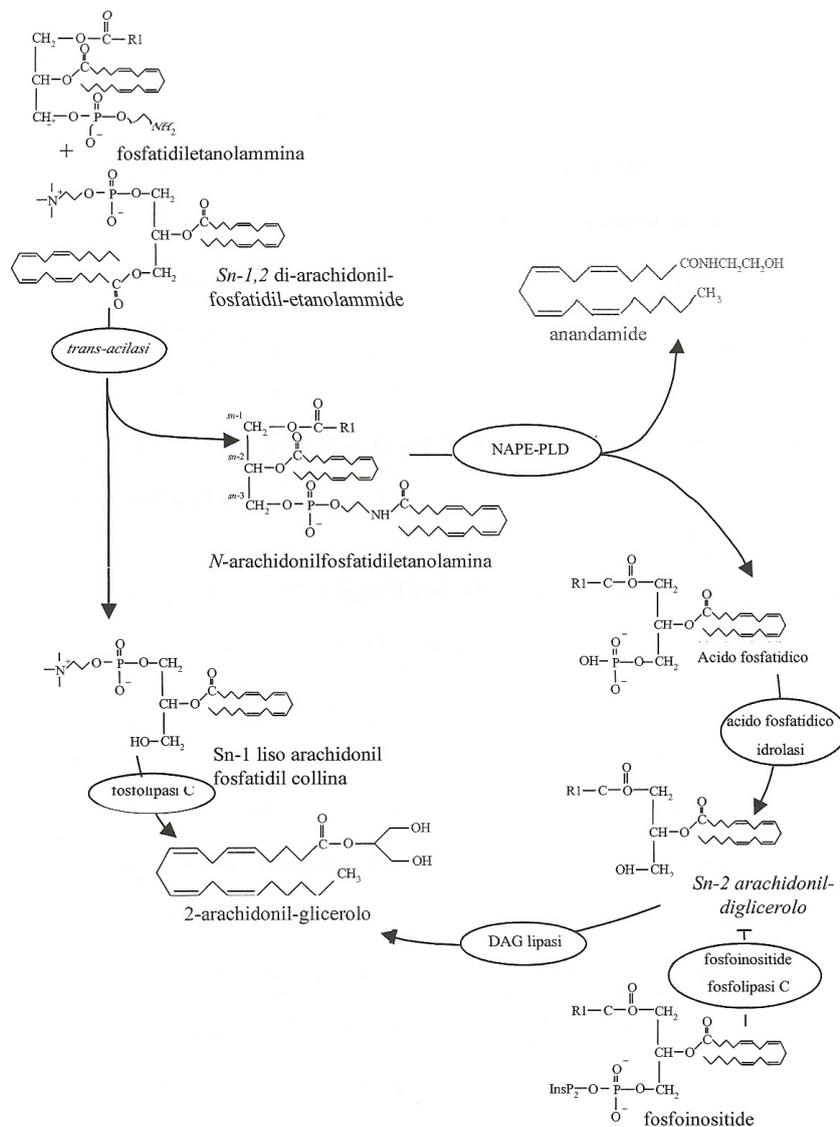


Fig.3

La biosintesi del 2-AG coinvolge differenti tipi di precursori fosfolipidici contenenti acido arachidonico nella posizione 2, ivi compresi fosfoinositidi, fosfatidilcoline e acido fosfatidico, che sono convertiti a diacilgliceroli (DAG) contenenti acido arachidonico in posizione 2, attraverso reazioni che possono essere, rispettivamente, catalizzate da due enzimi calcio-sensibili: la PLC (fosfolipasi C) o l'idrolasi acido fosfatidico-specifica. Il 2-AG viene prodotto attraverso l'idrolisi dell'acido grasso esterificato sulla posizione sn-1 in una reazione catalizzata da una DAG-lipasi, sn-1 selettiva, della quale esistono due isoforme (DAGL α e DAGL β), recentemente clonate (Bisogno et al., 2003).

Per quanto concerne l'inattivazione, e quindi la terminazione degli effetti, è stato dimostrato che AEA ha una breve durata d'azione in vivo (Willoughby et al., 1997). In un primo momento l'AEA e il 2-AG sono trasportate nello spazio intracellulare, grazie ad un ipotizzato trasportatore selettivo (Di Marzo et al., 1994). Questa proteina, chiamata "anandamide membrane transporter" (AMT), media un processo di trasporto saturabile, temperatura-dipendente, sodio-indipendente e suscettibile di inibizione farmacologica (Hillard et al., 1997; Beltramo et al., 1997). Tuttavia, essendo stato solo parzialmente caratterizzato e non ancora clonato, ci sono ancora dubbi sulla reale esistenza di questo trasportatore, ed alcuni gruppi di ricerca sostengono che l'AEA passi all'interno delle cellule solo per diffusione passiva (Glaser et al., 2003).

L'enzima responsabile della degradazione dell'AEA è la FAAH (fatty acid amide hydrolase). La FAAH è una serina idrolasi (Omeir et al., 1999), membro della famiglia delle amidasi (Patricelli et al., 1999; Arreaza et al., 1997). La FAAH è presente sia nel SNC che in tessuti periferici, quali polmoni, reni e fegato, è in grado di catalizzare l'idrolisi ad un pH ottimale di 9-10, di quasi tutti i derivati degli acidi grassi con attività cannabimimetica, ivi inclusi AEA (Arreaza et al., 1997) e il 2-AG (Di Marzo et al., 1998). La degradazione del 2-AG, avviene per idrolisi anche da parte di un enzima, la monoacilglicerolo lipasi (MAGL) (Dinh et al., 2002). La MAGL è una serina idrolasi che idrolizza il monoacilglicerolo in glicerolo e acidi grassi ed è presente nel cervello, nelle zone di maggiore espressione di CB1, come l'ippocampo, la corteccia, il talamo e il cervelletto.

Già da molti anni numerosi gruppi di ricerca hanno concentrato la loro attenzione allo studio della farmacologia degli endocannabinoidi, interessandosi, soprattutto, agli effetti che anandamide (AEA) e 2-arachidonilglicerolo (2-AG) (o i loro derivati sintetici più stabili metabolicamente) esercitano sui mammiferi.

Notevoli progressi verso la comprensione dei meccanismi che regolano l'azione, la biosintesi ed l'inattivazione degli endocannabinoidi sono stati ottenuti anche attraverso l'utilizzo di composti sintetici con azione attivante o inibente sul sistema endocannabinoide stesso.

Tra questi ricordiamo:

1. agonisti ed antagonisti dei recettori CB1 e CB2 quali: CP-55,940, HU-210/243 e WIN-55212 tra gli agonisti, e SR 141716A e SR 144528 tra gli antagonisti;
2. inibitori dell'AMT quali: AM-404, OMDM-1, OMDM-2, VDM-11, VDM-13, UCM-707;
3. inibitori della FAAH quali: AA-5-HT, MAPF, AM-374, O1624 e URB-597.

Utilizzando questi “tools” farmacologici è stato possibile verificare se il sistema endocannabinoide fosse coinvolto in alcune condizioni fisiologiche e patologiche.

Espressione di CD133-1 e CD133-2

Molta attenzione è stata recentemente focalizzata sul ruolo delle cellule staminali (CSCs) nella formazione e progressione delle leucemie e delle neoplasie solide (Pardal R. et al., 2003; Clarke M.F. et al., 2004). In particolare nel modello CSC è stato proposto che solo una piccola frazione di cellule nel tumore è capace di proliferare e di autorinnovarsi, sostenendo così la crescita tumorale mentre la maggior parte della popolazione cellulare tumorale procede differenziandosi in cellule tumorali eterogenee che divengono il carattere fenotipico della neoplasia (Pardal R. et al., 2003; Clarke M.F. et al., 2004; Reya T. et al., 2001). CSCs sono state isolate in svariati tumori solidi comprendenti la prostata, il polmone, la mammella e l'ovaio, così come tumori cerebrali, melanomi ed osteosarcomi (Collins A.T. et al., 2005; Al-Hajj M. et al., 2003; Ponti D. et al., 2005; Kim C.F. et al., 2005; Bapat S.A. et al., 2005; Singh S.K., 2003; Fang D. et al., 2005; Parker Gibbs C. et al., 2005), sulla base della loro capacità clonogenica in vitro e della loro tumorigenicità in vivo (Al-Hajj M. et al., 2003; Ponti D. et al., 2005; Bapat S.A. et al., 2005; Yin A.H. et al., 1997). Comunque il peculiare profilo antigenico tipico delle cellule tumorali con proprietà di cellule staminali potrebbe essere di estrema importanza per facilitare la selezione delle CSC con lo scopo di migliorare la loro caratterizzazione biologica e di elaborare nuove strategie terapeutiche (target-based) (Pardal R.

et al., 2003; Clarke M.F. et al., 2004; Reya T. et al., 2001; Al-Hajj M. et al., 2004). Infatti è stato dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche esprimono i trasportatori MDR1 e ABC, coinvolti nella resistenza ai farmaci, e che risultano essere meno sensibili ad alcuni farmaci citotossici rispetto alle cellule progenitrici (Chaudhary P.M. et al., 1991; Zhou S. et al., 2001; Costello R.T. et al., 2000). Le cellule staminali isolate sia da tessuti del sistema nervoso centrale normale che neoplastico sia dal tessuto prostatico esprimono l'antigene CD133+ (Collins A.T. et al., 2005; Singh S.K. et al., 2003; Uccida N. et al., 2000; Richardson G.D. et al., 2004) codificato dal gene CD 133 (PROM-1). In particolare il gene che codifica il CD133 ha 2 varianti di splice chiamate Prom-1.s1 e Prom-1.s2; e la proteina prodotta è riconosciuta da tre differenti anticorpi contro differenti epitopi (CD133-1 e CD 133-2) (Yin A.H. et al., 1997; Yu Y. et al., 2002). Nonostante non siano ben conosciute le funzioni biologiche delle due varianti di splice di CD133, è stato ipotizzato che esse potrebbero giocare un ruolo chiave nell'interazione cellulare e potrebbero essere coinvolte in vario modo nello sviluppo fetale e nell'omeostasi degli organi (Yin A.H. et al., 1997; Yu Y. et al., 2002).

L'endometrio umano è uno dei tessuti che più si rigenera. Questa osservazione ha portato ad ipotizzare l'esistenza di cellule staminali endometriali (Padykula H.A. et al., 1991). Come in altri tessuti che si rigenerano quali intestino, cute, e midollo osseo, sono state identificate

cellule staminali adulte, anche nelle cellule stromali ed epiteliali di endometrio umano è stata documentata la presenza di cellule staminali (Gargett C.E., 2004; Chan R.W.S. et al., 2004). Fino ad oggi non sono stati riportati studi sulla presenza di epitopi CD 133-1 e CD 133-2 e dell' mRNA Prom-1.s1/Prom-1.s2 nel carcinoma endometriale.

I linea di ricerca: modulazione del sistema endocannabinoide nella carcinogenesi endometriale

Scopo della ricerca

Scopo di questa ricerca è stato di valutare se il processo infiammatorio, alla base della carcinogenesi endometriale, possa influenzare il sistema endocannabinoide (recettori dei cannabinoidi e suoi ligandi endogeni); infatti, alcuni studi indicano che i mediatori proinfiammatori, come NO e le citochine, possono modificare l'espressione dei recettori degli endocannabinoidi. Studi recenti hanno messo in evidenza che l'infiammazione può agire in sinergia all'esposizione agli estrogeni nello sviluppo del cancro endometriale. È stato dimostrato che le cellule neoplastiche endometriali sono sempre circondate da un infiltrato di cellule infiammatorie, come linfociti, neutrofili, macrofagi, e mast- cellule. Benchè il modo in cui l'infiammazione locale faciliti lo sviluppo del cancro dell'endometrio non sia ben conosciuto, i macrofagi sembrano giocare un ruolo chiave in questa patologia, attraverso la produzione di citochine infiammatorie e ossido nitrico (NO).

In particolare, la produzione di NO attraverso l'ossido nitrico sintetasi (NOS) è implicata in numerosi processi fisiologici e patologici, inclusa la mutagenesi. Infatti NO è responsabile della trasformazione dei tessuti da

normali a neoplastici attraverso la generazione di radicali liberi. Recentemente, i componenti attivi della Cannabis Sativa L. hanno suscitato nuova attenzione per la varietà delle loro attività farmacologiche. Una delle aree più eccitanti e promettenti della ricerca sui cannabinoidi è l'abilità di questi composti di controllare le decisioni cellulari di sopravvivenza/morte. Infatti i cannabinoidi possono indurre proliferazione e/o arresto della crescita in numerose cellule, come i neuroni, i linfociti, e varie cellule neuronali e non. Inoltre i cannabinoidi sono capaci di indurre apoptosi nei gliomi, nel PC-12 feocromocitoma e nei neuroni ippocampali in vitro. Più interessante, i cannabinoidi inducono la regressione dei gliomi, epitelomi, linfomi e carcinomi cutanei in vivo. Partendo dall'identificazione di una possibile correlazione tra l'abuso di marijuana durante la gravidanza e specifici problemi inerenti la gravidanza stessa (come il basso peso alla nascita, il parto pretermine, il sanguinamento, la mortalità perinatale, le malformazioni congenite e le complicanze neonatali), l'interesse sul ruolo degli endocannabinoidi sull'apparato riproduttivo femminile si è incrementato considerevolmente. Inoltre la scoperta della presenza di un'azione dei recettori dei cannabinoidi sull'utero (Iuvone T. et al. 2007), sia a livello miometriale che endometriale, ci ha spinto a studiare lo sviluppo di questo sistema non solo nelle patologie ostetriche, ma anche in numerose patologie uterine. Questo studio verrà pubblicato su J. Cell. Mol. Med (submitted).

Risultati

In questi 3 anni sono state selezionate 10 pazienti sottoposte a chirurgia radicale per carcinoma endometriale, diagnosticato mediante isteroscopia. Il trattamento chirurgico, da noi eseguito, è stato effettuato nelle 2 settimane successive l'isteroscopia. 10 pazienti, sottoposte ad office hysteroscopy per patologia uterina benigna, sono state selezionate per età, BMI e parità, e utilizzate come gruppo controllo. Tutte le pazienti hanno firmato un consenso informato approvato dall'Institutional Review Board.

Le linee cellulari umane di carcinoma endometriale (AN3CA) sono state conservate a 37°C al 5% di CO₂. Le cellule sono state coltivate in Eagle's Minimum Essential Medium supplementato con siero bovino fetale al 10% (ATCC, LGC Promochem, Italia).

Le cellule sono state mantenute in un appropriato terreno di crescita alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti per 24 ore prima della trasfezione. Un'adeguata concentrazione del reagente Polyfect Transfection e di pcDNA 3-h CB2 è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente in modo da formare il complesso, quindi le cellule confluenti sono state incubate con i complessi a 37°C per permettere l'espressione genica (Qiagen, Milano). Le cellule AN3CA sono state

incubate per 48 ore con un agonista (JWH 133) o un antagonista di CB2 (SR144528) (1 μ M) 24 ore dopo il processo di transfezione.

Le biopsie o le cellule tumorali sono state rapidamente omogeneizzate in 60 μ L di un buffer di lisi ipotonico ghiacciato.

Quantità equivalenti (50 μ g) di ogni campione sono state separate in minigel al 12% di SDS-polyacrilamide. Le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Laboratori Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le membrane sono state bloccate over-night e poi incubate per 1 ora con anti-CB1 (1:250 v/v), anti-CB2 (1:250 v/v), anti-MAGL (1:250 v/v) e anti-FAAH (1:250 v/v) (Cayman, MI, USA) per un'ora a temperatura ambiente, successivamente incubate con uno specifico anticorpo secondario coniugato alla perossidasi horseradish (HPR) (Dako, Golstrup, DK). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati con chemiluminescenza ECL (Amersham).

I tessuti sono stati tagliati, resi omogenei ed estratti con CHCl₃:MeOH:Tris-HCl 50mM ph 7.4 (1:1:1 del volume) contenenti 200 pmol di d8-AEA, d5-2-AG e d4-N-palmitoiletanolamina (PEA) come controllo interno. La fase organica contenente lipidi è stata essiccata, pesata e purificata mediante cromatografia open-bed su gel di silice ed analizzata con cromatografia liquida con isotopi diluiti e con (LC)-atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-mass spectrometry (MS) (LC-APCI-MS) usando un

apparato Shimadzu HPLC (LC-10 ADVP) accoppiato a Shimadzu (LCMS-2010) quadruple MS attraverso l'interfaccia Shimadzu APCI. L'analisi MS è stata effettuata in modalità SIM (selected ion-monitoring).

I livelli di AEA, 2-AG e PEA sono stati quantificati sulla base della loro area rapportata con l'area dei controlli interni. Le quantità in pmol sono state normalizzate per mg di tessuto umido.

L'esame istologico è stato effettuato fissando i pezzi operatori in paraformaldeide al 4% in PBS, in paraffina e poi tagliati con uno spessore di 4 μm . Le sezioni sono state deparaffinate e reidratate secondo tecnica standard, incubate con H₂O₂ al 3% per 15 minuti per bloccare l'attività perossidasi endogena e poi incubate con siero normale di coniglio per 30 minuti. Il ritrovamento dell'antigene è stato necessario per rivelare CB₂, le sezioni sono state pre-trattate con un buffer di citrato (Target Retrieval Solution, Dako, Carpinteria, CA) in un forno a microonde a 350W per 3 volte per 3 minuti. Gli anticorpi anti-CB₂ (1:100 v:v, Cayman, MI, USA) sono stati incubati per un'ora a 37°C. Come anticorpo secondario è stato utilizzato un anticorpo anti-rabbit envision peroxidase coniugated (Dako). La rilevazione dell'immunocolorazione è stata effettuata utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina.

MTT (3-[4,5-dimetiltiazolo-2yl]-2,5 difeniltetrazolium bromide) (5 mg/mL in DMEM) è stato aggiunto alle cellule trattate e poi incubate per 3 ore a

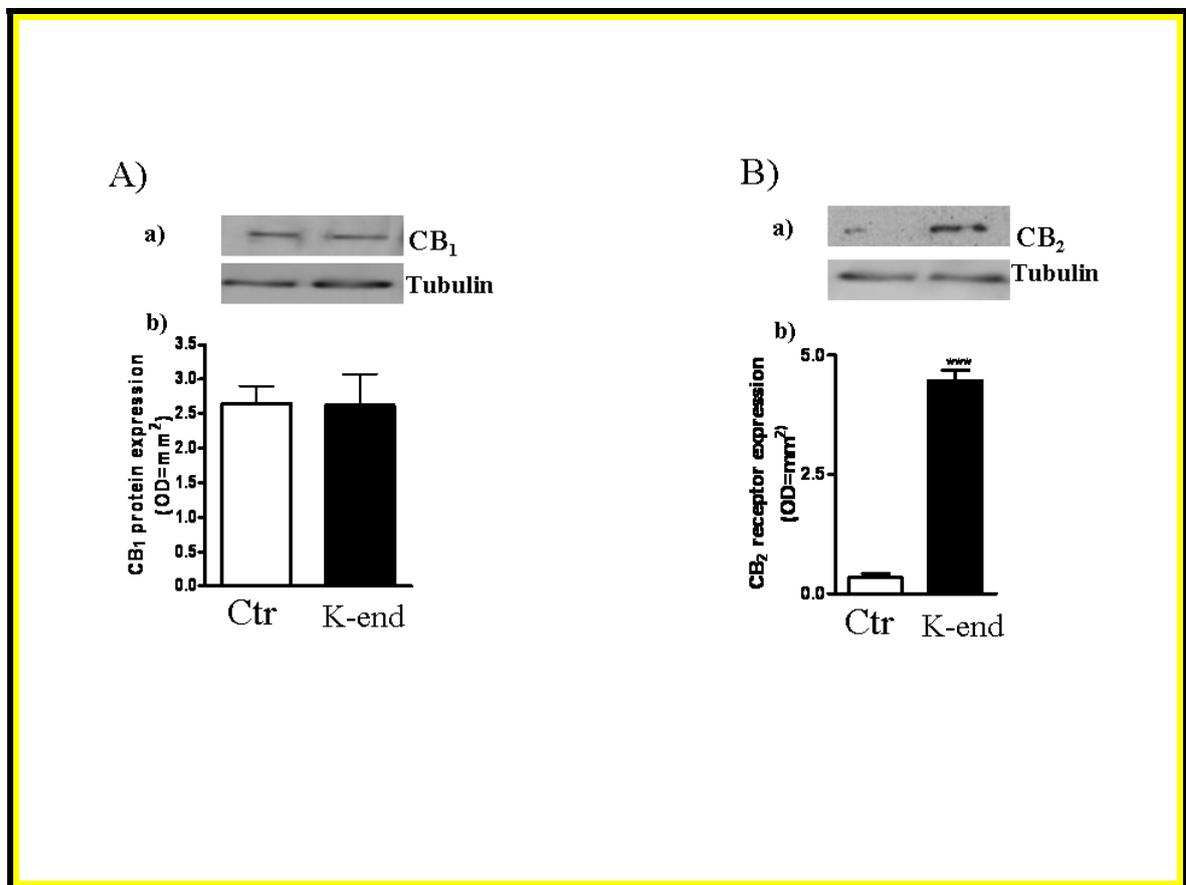
37°C. Dopo questo intervallo di tempo, le cellule sono state lisate e solubilizzate in cristalli blu scuro con una soluzione contenente il 50% di N,N'-dimetilformamide, il 20% di sodio dodecilsolfato ad un ph di 4.5. La densità ottica (OD) di ogni pozzetto è stata misurata con uno spettrofotometro microplate (Titertek Multiskan MCC/340) corredato di un filtro 620nm. Il segnale cellulare è stato calcolato con l'utilizzo di questa formula = (OD trattate/ OD controllo)x100.

Le cellule sono state omogeneizzate in 1 ml di Trizol (Invitrogen).

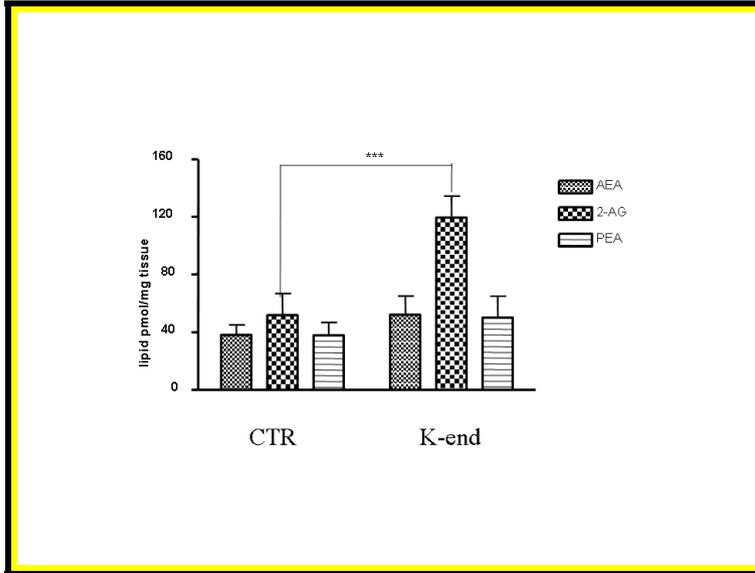
L'RNA totale è stato estratto secondo le raccomandazioni del produttore, disciolto in una soluzione di stoccaggio per RNA (Ambion), UV quantificato mediante un bio-fotometro (Eppendorf) e conservato a - 80°C. Dopo digestione mediante DNAsi (Ambion DNA-free Kit), la concentrazione e la purezza dei campioni di RNA sono state valutate mediante microchip RNA-6000-Nano, usando un Bioanalizzatore 2100 equipaggiato di un software 2100 (Agilent). Per tutti i campioni testati, l'integrità dell'RNA era maggiore di 6 (in una scala da 0 a 10). 3 microgrammi di RNA totale sono stati trascritti mediante trascrittasi inversa in 25 µl di miscela contenente: 50mM Tris-HCl ph 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitolo, 1 mM deossiribonucleotide trifosfato, 20 U di inibitore RNAsi (Invitrogen), 0.125 A 260 unità di esanucleotide per priming random e 200 U di MoMuLV Superscript III trascrittasi inversa. La miscela è stata incubata in un

termocycler iCycler-iQ per 5 minuti a 55°C, seguito da un rapido raffreddamento per 2 minuti a 4°C. Il processo è stato bloccato in questa fase e la trascrittasi inversa MoMuLV è stata aggiunta ai campioni, tranne che nei controlli negativi (-RT). L'incubazione è stata ripresa con 2 passaggi termici: 10 minuti a 20°C e poi 90 minuti a 50°C. Infine, la reazione è terminata col riscaldamento a 95°C per 10 minuti. La PCR quantitativa real time è stata eseguita con un iCycler-iQ in una soluzione 25- μ l contenente: 1 x iQ SYBR-Green Supermix (Bio-Rad), 20 ng di DNA complementare (cDNA; calcolato sulla base di RNA trascritto con la transcriptasi inversa), e 330 nM per ogni primer. I Primer ottimizzati per l'analisi SYBR-Green sono stati progettati mediante il software Beacon-Designer versione 6.0 (Biosoft International, Palo Alto, CA) e sono stati sintetizzati da MWG-Biotech AG, Germania. Il saggio è stato effettuato per 4 volte (massimo Δ Ct per campione replicato inferiore a 0.5), ed è stata inclusa una curva standard ottenuta mediante 5 diluizioni consecutive (100 a 0.16 ng) di pool di cDNA rappresentativi di tutti i campioni inclusi. L'analisi dell'espressione relativa, corretta per l'efficienza della PCR e normalizzata rispetto al gene della β actina e della gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GADPH) è stata ottenuta mediante software GENEX (Bio-Rad) per comparazioni di gruppi ed analisi statistica.

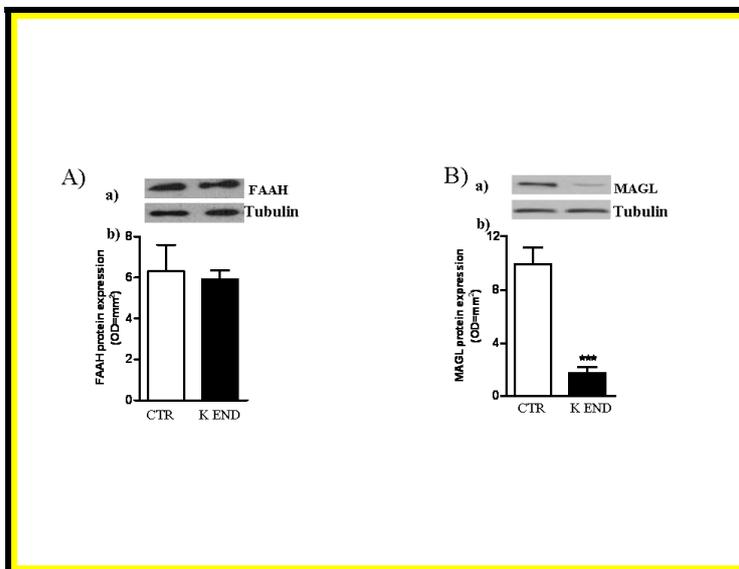
L'analisi immunoblotting ha mostrato un incremento dell'espressione dei recettori CB2 nelle biopsie endometriali di donne affette da carcinoma endometriale rispetto a quelle sane. Interessante invece il fatto che non è stata dimostrata differenza significativa per quanto riguarda l'espressione dei recettori CB1 nelle biopsie endometriali di donne sane e di donne affette da carcinoma endometriale.



L'analisi spettrometrica delle biopsie di donne affette da carcinoma endometriale ha mostrato un incremento significativo dei livelli di 2-AG mentre gli altri cannabinoidi quali AEA, palmitolietanolamina (PEA) o altri analoghi antinfiammatori AEA, non sono significativamente aumentati.

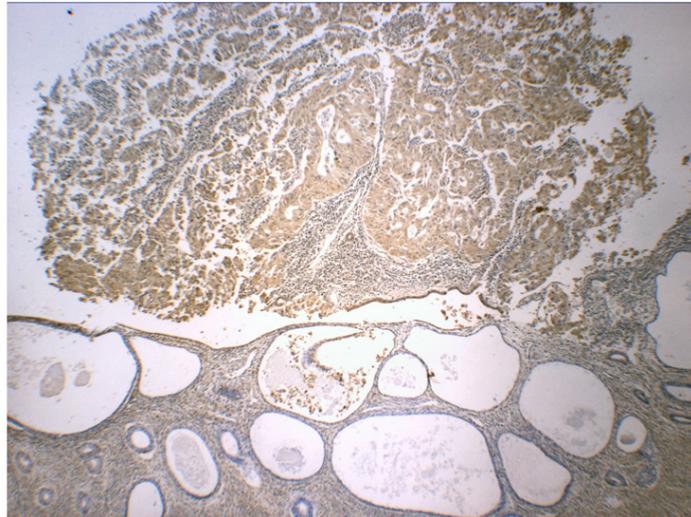


L'analisi immunoblotting ha mostrato che l'espressione della proteina MAGL è ridotta in maniera significativa nelle biopsie endometriali di donne malate, non esiste invece differenza significativa nell'espressione della proteina FAAH.



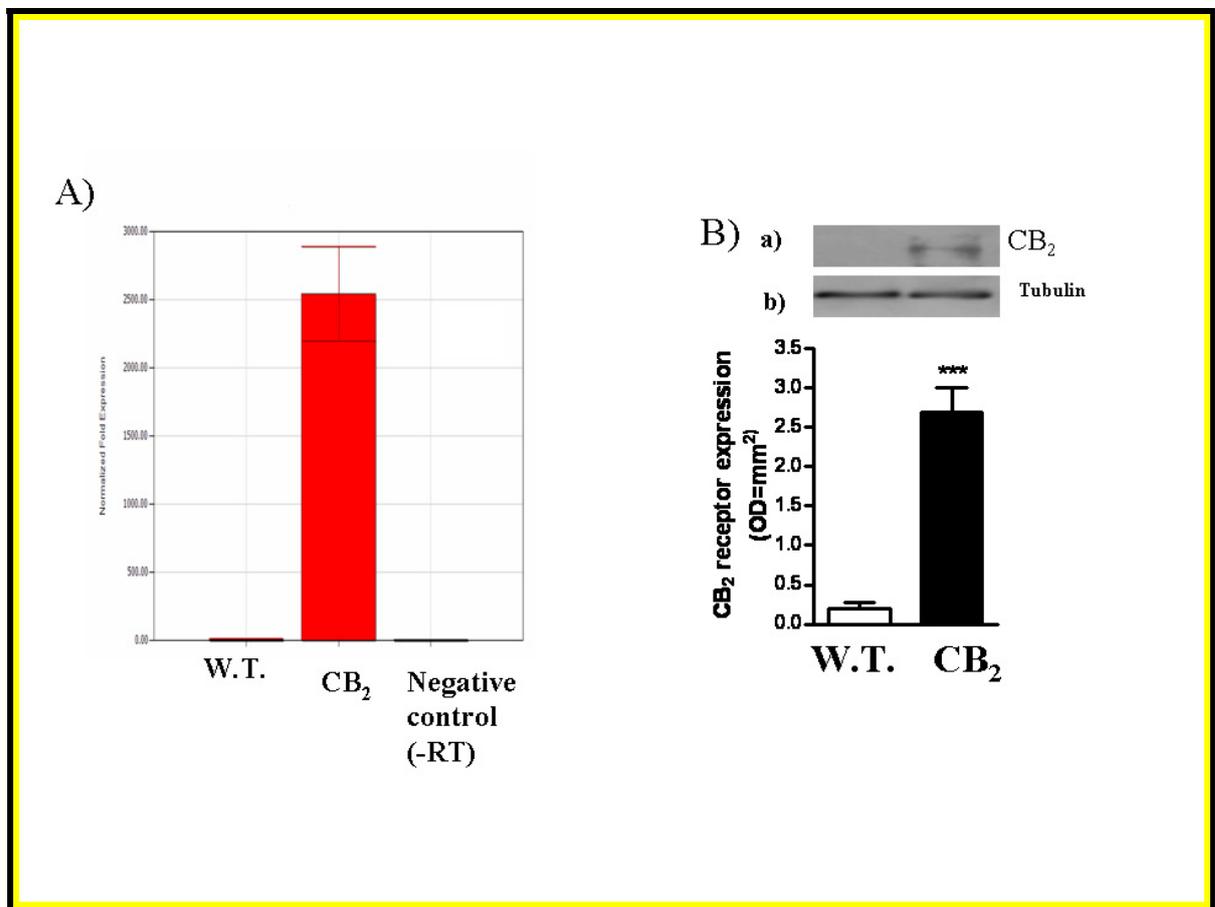
L'analisi immunoistochimica delle biopsie endometriali di donne affette da carcinoma endometriale ha mostrato che i recettori CB2 sono selettivamente

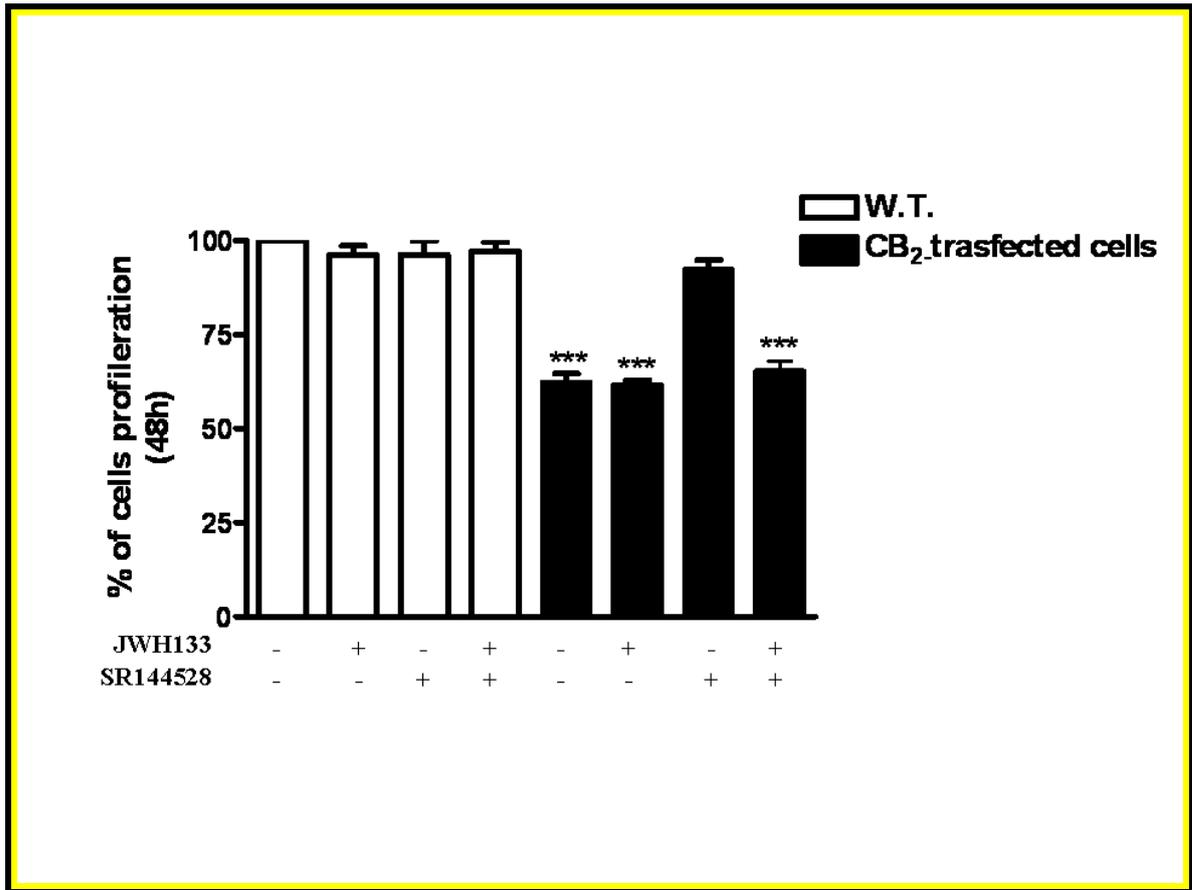
espressi solo nelle cellule tumorali mentre non sono identificabili nelle cellule di donne sane.



Nonostante la presenza di elevati livelli di recettori CB2 nelle biopsie endometriali di pazienti affette da carcinoma endometriale, l'analisi quantitativa real time PCR e western Blot effettuate in cellule AN3CA hanno mostrato una espressione quasi nulla del recettore CB2 sia come mRNA sia come proteina. Di conseguenza quando le linee cellulari AN3CA vengono trattate con agonisti selettivi dei recettori CB2 nessun effetto è stato riscontrato sulla proliferazione cellulare. Per questo motivo abbiamo deciso di esprimere temporaneamente nelle cellule AN3CA un plasmide contenente un cDNA codificante CB2. L'espressione è stata correttamente dimostrata mediante PCR real time e Western Blot ed ha portato ad una riduzione della

proliferazione cellulare rispetto al resto delle cellule. Utilizzando l'antagonista del recettore CB2 (SR 144528) si è osservato un'inversione del processo della riduzione della proliferazione cellulare. L'agonista del recettore CB2 (JWH133), da solo, non ha mostrato nessun effetto, se aggiunto dopo SR144528 ripristina la ridotta proliferazione nelle cellule transfettate.





I nostri dati supportano l'ipotesi di un ruolo dei recettori CB₂ nel controllo dello sviluppo cellulare del carcinoma endometriale.

ACTIVATION OF THE ENDOCANNABINOID SYSTEM IN ENDOMETRIAL CARCINOMA: POSSIBLE ROLE IN CANCER CELL GROWTH CONTROL OF CANNABINOID CB₂ RECEPTOR

M. Guida^{*,4}, D. De Filippis^{*,1,2}, A. Ligresti,^{*,1,3} A. D'Amico^{1,2}, A. Di Spiezio Sardo⁴, S. Petrosino,^{1,3} M. Borriello⁴, S. Simonetti⁵, P.Orlando^{1,3}, L. Insabato⁵, C. Nappi⁴, V. Di Marzo^{1,3,#} and T. Iuvone^{1,2,#}

¹Endocannabinoid Research Group, ²Department of Experimental Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Naples "Federico II", via D. Montesano 49, 80131 Napoli, ³Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Campi Flegrei 34, Pozzuoli, Naples, Italy, ⁴Department of Gynecology and Obstetrics and Pathophysiology of Human Reproduction, via Pansini, 80131 Naples, ⁵Department of Biomorphologic and Functional Sciences, Pathology Section, University of Naples "Federico II", via Pansini, 80131 Naples

Abstract

The endocannabinoid system plays protective functions against the growth and the spreading of several types of carcinomas but its involvement in endometrial carcinoma still remain poorly investigated. In line with this idea, in endometrial carcinoma biopsies, we observed a selective elevation of CB₂ receptors, their ligand, 2-arachidonoylglycerol and a down-regulation of monoacylglycerol lipase. Moreover immunohistochemical analysis showed that the over-expression of CB₂ receptors occurred exclusively on malignant endometrial cells, so we switched our study in a transformed human cell line of endometrial carcinoma, AN3CA. These cells were not endowed with CB₂ receptors therefore we transfected them with this receptor. CB₂-transfected cells showed a significant reduction in cell vitality, in confront to untransfected AN3CA cells and a selective CB₂ antagonist, reported the viability of transfected cells to the control levels. Our results showed that the up-regulation of CB₂ receptors in human endometrial carcinoma may account for a tumour-suppressive action.

Introduction

Worldwide, endometrial carcinoma is the seventh most common malignant disease, but its incidence varies among regions [1]. Epidemiologic data suggest an imbalance of estrogens and progesterone in the aetiology of endometrial cancer [2]. Exposure to endogenous or exogenous estrogens not adequately opposed by progesterone leads to an increase in the mitotic activity of endometrial epithelial cells and increased DNA replication and repair errors, which, in turn, can lead to somatic mutations that may ultimately result in endometrial hyperplasia and subsequent malignancy [2]. Estrogens are also the main players in the development of endometrial cancer [3]. In recent years, cannabinoids, the active components of *Cannabis sativa L.* have attracted renewed attention because of the variety of their pharmacological activities. Both natural and synthetic cannabinoids activate two different cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂) [4,5]. CB₁ receptors are predominantly expressed in the central nervous system, although they are also present in non-neuronal cells and tissues, such as immune cells [6] and reproductive tissues [7]. The CB₂ receptors are mainly expressed by immune cells [8], where they modulate cytokine release and immune-cell migration. Endogenous ligands for CB₁ and CB₂ have been identified and named endocannabinoids, among them the most investigated are *N*-arachidonoyletanolamine (anandamide) (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) [9,10]. AEA has greater CB₁ than CB₂ affinity and efficacy, while 2-AG exhibits full agonist activity at both receptor types [11]. One of the most exciting and promising areas of current cannabinoid research is the ability of these compounds to control the cell survival/death fate. In fact, cannabinoids may induce proliferation, and/or growth arrest, in a number of cells, including neurons, lymphocytes, and various transformed neural and non-neural cells. Moreover cannabinoids have been shown to induce apoptosis in gliomas cells [12], PC-12 pheochromocytoma [13] and hippocampal neurones [14] *in vitro*. Most interestingly, cannabinoids have been described to induce the regression of several tumour types as gliomas, epitheliomas, lymphomas, colon, prostate and breast carcinomas and melanomas both *in vitro* and *in vivo* [15-19]. In many of these types of cancer, elements of the endocannabinoid system have been shown to undergo changes (usually increases) in levels and or activity, thus leading to suggest a possible role of endocannabinoids in cancer control. Intriguingly, no studies have been performed so far on the possible role of endocannabinoids and cannabinoid receptors in cancers of the female reproductive system.

Sex steroids, and estrogens in particular, have been shown to regulate cannabinoid receptor expression in physiological states, such as in the human anterior pituitary gland. Furthermore, estrogens also regulate CB₁ mRNA expression and endocannabinoid levels in the rat pituitary gland and hypothalamus [20], and the expression of a major endocannabinoid inactivating enzyme, the fatty acid amide hydrolase (FAAH) [21,22]. No data are available regarding the regulation by estrogens of CB₂ receptors or of the major 2-AG-inactivating enzyme, the monoacylglycerol lipase (MAGL). Also during pathological conditions such as colon cancer, breast cancer and glioma, estrogens seem to regulate the endocannabinoid system [23]. The presence of appreciable amounts of cannabinoid receptors, as well as estrogen receptor expression, has already been established in colorectal carcinoma and normal colonic epithelium [24].

On the basis of this background, the aim of this study was: to evaluate the involvement of the endocannabinoid system and to establish its possible role during the progression of endometrial carcinoma by using biopsies from patients affected by this type of cancer and human endometrial carcinoma cell-line.

Materials and Methods

Patients

Ten consecutive cases undergoing surgical treatment for endometrial carcinoma at the Department of Obstetrics and Gynecology of University of Naples “Federico II” were enrolled in the study. The cancer was histologically diagnosed to all patients by means of target biopsies performed during outpatient hysteroscopies. In all patients, staging surgery was performed within 2 weeks of the hysteroscopy. Ten patients matched for age, BMI and parity undergoing an office hysteroscopy for benign conditions were used as controls. All patients signed an informed consent to participate to the study, which was approved by our Institutional Review Board. Vaginal and cervical swabs were performed a week before the hysteroscopy and did not reveal any sign of cervical and/or vaginal infections in all patients.

Cell Cultures

Human endometrial cancer cell lines (AN3CA) were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 10% of Foetal Bovine Serum according to the supplier's information (ATCC, LGC Promochem, Italy).

Transient transfection

Cells were seeded (2×10^5 cells/well in 6well-plates) 24 hours prior transfection in appropriate growth medium. The appropriate ratio of Polyfect Transfection Reagent and pcDNA3-hCB₂ was incubated 10 minutes at room temperature to allow complex formation and then confluent cells were incubated with the complex at 37°C to allow gene expression according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Milan, Italy). AN3CA cells were incubated for 48 hours with agonist (JWH133) (10 μM) or antagonist of CB₂ (SR144528) (1 μM) 24 hours after transfection.

Western blot analysis

Biopsies or cancer cells were rapidly homogenized in 60 μL of ice-cold hypotonic lysis buffer.. Equivalent amounts (50 μg) of each sample were separated under reducing conditions in 12% SDS-polyacrylamide minigel. The proteins were transferred onto nitrocellulose membrane according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked over-night and then incubated for 1 h with anti-CB₁ (1:250 v/v), anti-CB₂ (1:250 v/v), anti-MAGL (1:250 v/v) and anti-FAAH (1:250 v/v) (Cayman, MI, USA) for 1 h at room temperature, followed by incubation with specific horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Dako, Golstrup, DK). The immune complexes were developed by chemiluminescence ECL (Amersham).

Endocannabinoid measurement

Tissues were dounce-homogenized and extracted with CHCl₃:MeOH:Tris-HCl 50mM pH 7.4 (1:1:1 by volume) containing 200pmol of d₈-AEA, d₅-2-AG and d₄-N-palmitoylethanolamine (PEA) as internal standards. Lipid-containing organic phase was dried down, weighed and purified by open-bed chromatography on silica gel and analyzed by isotope dilution liquid chromatography (LC)-atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-mass spectrometry (MS) (LC-APCI-MS) using a Shimadzu HPLC apparatus (LC-10ADVP) coupled to a Shimadzu (LCMS-2010) quadrupole MS via a Shimadzu APCI interface. MS analyses were carried out in the selected ion-monitoring (SIM) mode. AEA, 2-AG and PEA levels were quantified on the basis of their area ratio with deuterated internal standards signal area. Amounts in pmols were normalized per mg of wet tissue.

Histological analysis

Histology was carried out on surgical specimens fixed in 4% paraformaldehyde solution in PBS, paraffin-embedded and cut at 4 μm with stains for standard histological diagnosis. Sections were deparaffinised and rehydrated with standard procedures, incubated with H_2O_2 3% for 15 min to block endogenous peroxidase activity and then incubated with normal rabbit serum for 30 min.

Antigen retrieval was necessary for revealing CB_2 : slides were pre-treated with citrate buffer (Target Retrieval Solution, Dako, Carpinteria, CA) in a microwave at 350W 3 times for 3 min. Anti- CB_2 (1:100 v:v; Cayman, MI, USA) antibodies were incubated for 1 h at 37°C. As secondary antibody, anti-rabbit envision peroxidase conjugated (Dako), was used. Detection of immunostaining was performed using diaminobenzidine (Dako) as chromogene.

MTT-formazan assay

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide) (5mg/mL in DMEM) was added to the cells treated as above described and cells were incubated for additional 3 h at 37°C. After this time interval, cells were lysed and dark blue crystals solubilized with a solution containing 50% (v/v) N,N'-dimethyl formamide, 20% (w/v) sodium dodecylsulphate with an adjusted pH of 4.5. The optical density (OD) of each well was measured with a microplate spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC/340) equipped with a 620 nm filter. The cell viability was thus calculated as % of cell viability = (OD treated/OD control) x 100.

Real time PCR

Cells were homogenized in 1 ml of Trizol® (Invitrogen). Total RNA was extracted according to manufacturer recommendations, dissolved in RNA storage solution (Ambion), UV quantified by a Bio-Photometer® (Eppendorf), and stored to -80°C. After DNase digestion (Ambion deoxyribonucleic acid [DNA]-free™ kit), concentration and purity of RNA samples were evaluated by the RNA-6000-Nano® microchip assay, using a 2100 Bioanalyzer® equipped with a 2100-Expert-Software® (Agilent), following the manufacturer instructions. For all samples tested, the RNA integrity number was greater than 6 (relatively to a 0–10 scale). Three micrograms of total RNA, as evaluated by the 2100 Bioanalyzer, was reverse transcribed in a 25- μl reaction mixture containing: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 1 mM deoxyribonucleotide triphosphates, 20 U of RNase inhibitor

(Invitrogen), 0.125 A260 units of hexanucleotide mixture (Invitrogen) for random priming and 200 U of MoMuLV Superscript® III reverse transcriptase (Invitrogen). The reaction mixture was incubated in a thermocycler iCycler-iQ® for a 5 min at a 55°C step, followed by a rapid chilling for 2 min at 4°C. The protocol was stopped at this step and the MoMuLV reverse transcriptase was added to the samples, excepting the negative controls (-RT). The incubation was resumed by two thermal steps: 10 min at 20°C followed by 90 min at 50°C. Finally, the reaction was terminated by heating at 95°C for 10 min. Quantitative real-time PCR was performed by an iCycler-iQ® in a 25- μ l reaction mixture containing: 1 \times iQ-SYBR®-Green-Supermix (Bio-Rad), 20 ng of complementary DNA (cDNA; calculated on the basis of the retro-transcribed RNA), and 330 nM for each primer. Optimized primers for SYBR®-Green analysis (and relative TaOpt) were designed by the Beacon-Designer® software 6.0 version (Biosoft International, Palo Alto, CA) and were synthesized (high-performance liquid chromatography purification grade) by MWG-Biotech AG, Germany. Assays were performed in quadruplicate (maximum Δ Ct of replicate samples less than 0.5), and a standard curve from consecutive fivefold dilutions (100 to 0.16 ng) of a cDNA pool representative of all samples was included. Relative expression analysis, correct for PCR efficiency and normalized with respect to reference genes β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), was performed by GENEX software (Bio-Rad) for groupwise comparison and statistical analysis.

Results

Selective up-regulation of CB₂ receptors in biopsies of patients with endometrial carcinoma

Immunoblotting analysis revealed that CB₂ receptor protein expression was significantly increased in endometrial biopsies deriving from endometrial carcinoma patients respect to healthy patients. Interestingly, no significant differences in CB₁ receptor protein expression was observed between biopsies deriving from endometrial carcinoma and healthy patients (Fig.1).

Selective up-regulation of 2-AG in endometrial carcinoma biopsies.

Mass-spectrometry analysis of endometrial carcinoma biopsies revealed a significant increase in 2-AG levels in comparison with biopsies from healthy patients. In contrast, no significant increase in the levels of

the other endocannabinoid, AEA, or of the anti-inflammatory AEA analogue, palmitoylethanolamine (PEA), was observed in endometrial carcinoma biopsies in comparison with biopsies from healthy patients (Fig. 2).

Selective down-regulation of MAGL in endometrial carcinoma biopsies.

Immunoblotting analysis revealed that MAGL protein expression was significantly decreased in endometrial biopsies deriving from endometrial carcinoma patients respect to healthy patients. Interestingly, no significant differences in FAAH protein expression was observed between biopsies deriving from endometrial carcinoma and healthy patients (Fig. 3).

Selective presence of CB₂ receptor on tumour cells in carcinoma biopsies.

Immunohistochemical analysis of endometrial carcinoma biopsies revealed that CB₂ receptors are selectively expressed only in tumour cells while they are undetectable in healthy cells from the same biopsies (Fig. 4).

CB₂ expression in AN3CA

Despite the presence of high levels of CB₂ receptors in endometrial biopsies of patients with endometrial carcinoma, little if any mRNA and protein expression of CB₂ receptor was observed by quantitative real-time PCR and Western Blot in AN3CA cells (Fig. 5). Accordingly, when the AN3CA cell lines was treated with selective CB₂ agonists no effect was found on cell proliferation (Fig. 6). For this reason we decided to transiently express in AN3CA cells a plasmid containing a CB₂ –encoding cDNA. Expression was successful assessed by real-time PCR and Western Blot (Fig. 5) and led to reduced cell proliferation as compared to resting cells, in a way that was fully reversed by the CB₂ receptor antagonist SR144528 but not enhanced by the CB₂ receptor agonist JWH133 (Fig. 6). The latter compound, however, did reverse the effect of SR144528 and restored a reduced proliferation in CB₂-transfected AN3A cells (Fig. 6).

Discussion

Stemming from the identification of a possible correlation between *marijuana* abuse during pregnancy and specific problems (such as low foetal birth weight, pre-term delivery, miscarriage, stillbirth, congenital malformation, and neonatal complications), the interest in the role of the endocannabinoid system in the

female reproductive apparatus has increased considerably. Moreover the discovery of the presence of functional cannabinoid receptors in the uterus, both in the myometrium and endometrium, led to investigate the involvement of this system not only in pregnancy disorders, but also in numerous pathologies affecting the uterus, such as endometritis in women [25]. In this study, we observed a significant up-regulation of CB₂ receptor signalling in biopsies from women affected by endometrial carcinoma. In fact, we found that not only CB₂ receptors were selectively up-regulated in biopsies of endometrial carcinoma, but the complete endogenous machinery for CB₂ activation was also altered, since the levels of 2-AG, the most efficacious endogenous CB₂ ligand, were elevated, possibly as a result of the decrease in the expression of MAGL, the selective enzyme involved in 2-AG breakdown. On the other hands, CB₁ receptors and AEA, a more selective endogenous ligand for CB₁, as well as FAAH, the most important AEA metabolizing enzyme, even though expressed in healthy endometrial tissues, remain unchanged after cell transformation. Likewise, the levels of the AEA homologue and anti-inflammatory mediator, PEA, which does not interact with cannabinoid receptors *per se*, were also unaltered.

Among the several cell types that could express CB₂ receptors, immunohistochemical analysis of endometrial carcinoma biopsies revealed that only cancer cells were specifically stained for this protein which was instead completely absent in normal endometrial tissue of the same biopsy. The selective expression of CB₂ receptors in malignant endometrial cells suggest that they might play an important role in the growth of endometrial carcinoma. In fact, the endocannabinoid system controls cell survival/death decision [26] by inhibiting or stimulating cell growth. Cannabinoids produce their effects by the modulating several important intracellular pathways such as mitogen- and stress-activated protein kinase cascades (ERK, JNK, p38), the rescue of Wnt/beta-catenin pathways or ceramide generation, which all play key roles in cell fate [27]. Thanks to its participation in cell cycle regulation, stimulation of cannabinoid receptors led to a strong anti-tumour effects both *in vitro*, in rat glioma C6 cells and in human non-small cell lung cancer cell lines, and *in vivo*, in mouse lung carcinoma, thyroid epithelioma, breast and colonrectal carcinoma, and melanoma as well as in gliomas [28-31].

In order to well characterize the significance of CB₂ over-expression in endometrial carcinoma, we carried out a series of experiments in cell cultures. In line with the idea of CB₂ as a mechanism controlling cancer-cell growth, AN3CA, a representative human endometrial carcinoma cell-lines, expressed little if any CB₂ receptors. Thus, we reasoned that these established cell lines managed to keep growing in culture

because of suppression of CB₂ receptor expression, a property that these cells seem to share with other transformed human cell lines from the uterus and ovaries (A. Ligresti, P. Orlando, T. Iuvone and V. Di Marzo, unpublished observations). In order to gain some support to this hypothesis, we transfected AN3CA cells with cDNA encoding for the human CB₂ receptor. As expected, transfection of cells resulted in a lower viability compared to mock-transfected cells, an effect that appeared to be specifically due to the expression of CB₂ receptors and introduction of tonic CB₂ receptor activity, since it was blocked by a selective CB₂ antagonist. These data clearly support a role for CB₂ receptors in the control of endometrial carcinoma cell growth.

With these observations in mind, it is possible to speculate that cancer cells try to respond to malignant transformation by expressing on CB₂ receptors and, at the same time, by up-regulating 2-AG levels via the down-regulation of its degradation by MAGL, and that in turn the activation of CB₂ receptors by 2-AG control the proliferation of the transformed cells. Therefore, selective CB₂ agonists, which are devoid of the typical psychotropic effects of CB₁ receptor agonists, might represent the basis for the development of new anti-tumour compounds against endometrial carcinoma, since they can kill tumour cells possibly without affecting their non-transformed counterparts [32]. Moreover, the specific expression of CB₂ receptors only in transformed cells might represent a new marker for the diagnosis of endometrial carcinoma. In fact, to date, prognostic parameters for endometrial carcinoma can be divided into uterine and extrauterine factors, the former of which include histological grading, depth of myometrial invasion, vascular invasion, presence of atypical endometrial hyperplasia, cervical involvement, DNA haploids, S-phase fraction and hormone receptor status; the latter include patient age, positive peritoneal cytology, annexal involvement, pelvic and para-aortic lymphonode and peritoneal metastasis [33]. However, new molecular biology and immuno-histochemical techniques are trying to identify new, more specific, prognostic factors that can be correlated with the carcinoma process [34].

In conclusion, our present results suggest a potential role of CB₂ receptors in the endogenous control of endometrial carcinoma growth and their possible use as both a new prognostic factor and, above all, a new target for the development of chemotherapeutic agents to be used alone or in combination with other drugs against this type of cancer.

References

1. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2005) Endometrial cancer. *Lancet* 366:491-505
2. Modugno F, Ness RB, Chen C, Weiss NS (2005) Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2840-7
3. Doherty JA, Cushing-Haugen KL, Saltzman BS, Voigt LF, Hill DA, Beresford SA, Chen C, Weiss NS (2007) Long-term use of postmenopausal estrogen and progestin hormone therapies and the risk of endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 197:139.e1-7
4. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-4
5. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-5
6. Small-Howard AL, Shimoda LM, Adra CN, Turner H (2005) Anti-inflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells. *Biochem J* 388:465-73
7. Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C (2005) Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 90:984-91
8. Lunn CA, Reich EP, Bober L (2006) Targeting the CB2 receptor for immune modulation. *Expert Opin Ther Targets* 10:653-63
9. Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168:1-51

10. Di Marzo V, Petrosino S (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18:129-40
11. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45:405-46
12. Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M (2004) Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology* 47:315-23
13. Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I (2000) Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett* 472:39-44
14. Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR (1998) Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Neurosci* 18:5322-32
15. Bifulco M, Di Marzo V (2002) Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med* 8:547-50
16. Guzmán M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-55
17. Flygare J, Sander B (2007) The endocannabinoid system in cancer-Potential therapeutic target? *Semin Cancer Biol* [in press]
18. Bifulco M, Laezza C, Gazerro P, Pentimalli F (2007) Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion. *Oncol Rep* 17:813-6
19. Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq V, Mukhtar V (2008) Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res* 68:339-42

20. González S, Mauriello-Romanazzi G, Berrendero F, Ramos JA, Franzoni MF, Fernández-Ruiz J (2000) Decreased cannabinoid CB1 receptor mRNA levels and immunoreactivity in pituitary hyperplasia induced by prolonged exposure to estrogens. *Pituitary* 3:221-6
21. Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agrò A (2000) Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem* 267:2991-7
22. Waleh NS, Cravatt BF, Apte-Deshpande A, Terao A, Kilduff TS (2002) Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* 291:203-10
23. Bloch E, Thyssen B, Morrill GA, Gardner E, Fujimoto G (1978) Effects of cannabinoids on reproduction and development. *Vitam Horm* 36:203-58
24. Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V (2003) Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 125:677-87
25. Iuvone T, De Filippis D, Di Spiezio Sardo A, D'Amico A, Simonetti S, Sparice S, Esposito G, Bifulco G, In sabato L, Nappi C, Guida M (2008) Selective CB₂ up-regulation in women affected by endometrial inflammation. *J Cell Mol Med* 12:661-670
26. Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95:175-84
27. Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-82

28. Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Bisogno T, Petrosino S, Scuderi C, Di Marzo V, Steardo L (2007) Endocannabinoid Research Group. Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro. *J Mol Med* 85:1379-92
29. Preet A, Ganju RK, Groopman JE (2008) Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene* 27:339-46
30. Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M (2006) Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 20:2633-5
31. Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M (2008) Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res* 68:1945-52
32. McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2002) Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 100:627-34
33. Prat J (2004) Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 35:649-62
34. Mazurek A, Pierzyński P, Kuć P, Kopinski P, Terlikowski S, Niklińska W, Trojan J, Ludański T (2004) Evaluation of angiogenesis, p-53 tissue protein expression and serum VEGF in patients with endometrial cancer. *Neoplasma* 51:193-7

II linea di ricerca: modulazione dell'espressione di CD-133-1 e CD-133-2 nel carcinoma endometriale

Scopo della ricerca

La sperimentazione proposta in questa seconda parte del progetto di ricerca è finalizzata all'identificazione ed alla caratterizzazione di una popolazione di cellule staminali tumorali nelle neoplasie endometriali mediante la valutazione dell'espressione degli epitopi CD 133-1+ e CD 133-2+ e la caratterizzazione biologica delle cellule tumorali endometriali CD133+ secondo parametri clinico-patologici. Tutto ciò potrebbe essere utile per identificare nuovi fattori prognostici e terapeutici sia nella patologia uterina benigna che maligna.

Risultati

Abbiamo arruolato 21 pazienti affette da carcinoma dell'endometrio, sottoposte a chirurgia primaria, i cui campioni di tessuto tumorale sono stati ottenuti ed analizzati secondo le tecniche successivamente esposte. Tutte le pazienti avevano un'età compresa tra 49 e 79 anni (mediana 58), 10 pazienti avevano uno stadio FIGO IB, 5 IC, 2 II, 1 IIIA e 3 IIIC. L'80% dei tumori erano adenocarcinomi endometrioidi mentre il 20% erano sierosi; il 19% dei casi erano ben differenziati (G1), 62% moderatamente differenziati (G2) e il 19% erano scarsamente differenziati (G3). Al momento del campionamento il tessuto è stato separato in due metà: una metà è stata usata per confermare la diagnosi istologica finale, la seconda metà è stata usata per l'isolamento, la purificazione e la coltura delle cellule CD133⁺. Entro 30 minuti dalla chirurgia, i tessuti tumorali sono stati meccanicamente ed enzimaticamente digeriti con Trypsin-EDTA (GIBCO) per 15 minuti, ed in seguito con Collagenasi I (1 mg/ml) per 3 ore a 37°C (Collins A.T. et al.,2001).

Dopo il lavaggio con buffer di fosfato salino (PBS), i tessuti sono stati incubati con soluzione di cloruro di ammonio (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) per 10 minuti a 4°C per eliminare le cellule della linea eritrocitaria. E' stata effettuata una selezione negativa di cellule CD45⁺ allo scopo di rimuovere le cellule ematopoietiche utilizzando CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germania).Utilizzando il CD133 Cell Isolation

Kit (Miltenyi Biotec) su una sospensione cellulare con AutoMACS abbiamo isolato le cellule CD133+ e CD133-. La CD 133-2phycoerythrin (PE) è stata utilizzata per valutare l'efficienza della separazione magnetica mediante citofluorimetria.

Le popolazioni cellulari CD133+ e CD133- isolate venivano risospese in RPMI 1640 supplementato con FBS al 10% ed utilizzate per il saggio di proliferazione cellulare e di limiting dilution. Per il saggio di limiting dilution, le cellule CD 133+ e CD 133- sono state posizionate in piastre a 96 pozzetti in 100 micro/l di MyeloCult H5100 (Stem Cell Technologies) addizionato con idrocortisone 10^{-6} M. La densità cellulare finale era di 1 cellula per pozzetto. Le colture cellulari venivano trattate con 100 microlitri di MyeloCult H5100 ogni giorno fino al 14° giorno quando le colonie (ciascuna composta da più di 30 cellule) venivano contate ed espresse come percentuale del numero di pozzetti piastrati. Il saggio di proliferazione cellulare è stato quindi effettuato posizionando le cellule CD133+ e CD133- in provette T25 con RPMI 1640 supplementato con FBS al 10%, ad una densità di 90000 cellule/ml. La conta cellulare è stata effettuata al 6° ed al 12° giorno utilizzando la camera di conta di Neubauer. La vitalità cellulare è stata determinata mediante il metodo Trypan Blue.

La determinazione delle cellule CD133+ è stata effettuata secondo il metodo di Yin et al. con piccole modificazioni (Yin A.H. et al., 1997).

Le cellule venivano incubate per 10 minuti al buio a 4 °C con il reagente FcR Bloking (Miltenyi Biotech) e i seguenti anticorpi monoclonali: CD133-1 PE, CD133-2 PE (Miltenyi Biotech) e CD45 FITC (Becton Dickinson, Mountain View CA) successivamente si procedeva ad una incubazione con 20 microgrammi/ml 7-AAd per 10 minuti a temperatura ambiente al buio. Gli anticorpi monoclonali coniugati venivano utilizzati per stabilire la fluorescenza di fondo. Le cellule venivano analizzate con citofluorimetro FACScan dotato di un laser ad argon a 488nm. I segnali di FITC e PE sono stati registrati a 530 e 575 nm rispettivamente. Lo spectral overlap è stato minimizzato mediante compensazione elettronica con Calibrite Beads (Becton Dickinson) prima di ciascuna determinazione. Sono stati registrati un minimo di 10000 eventi e acquisiti in list mode utilizzando un software CellQuest (Becton Dickinson). Per confermare la natura epiteliale delle cellule purificate CD133+ è stata misurata l'espressione della citocheratina 7 mediante la fissazione delle cellule CD133 con Fix e Perm (Caltag Laboratories) seguito da una incubazione per 1 ora a 4°C con un anticorpo monoclonale anti citocheratina 7 umana (DakoCytomation); un anticorpo anti mouse FITC (Becton Dickinson) è stato utilizzato come anticorpo secondario (Stimpfl M. et al., 1999). Per studiare la presenza di cellule endoteliali nelle preparazioni di cellule CD133+ purificate abbiamo utilizzato anticorpi monoclonali contro il VEGF R2 (KDR) (clone 89106, R&D Systems), CD

105 (clone SN6, Serotec), e l'anticorpo policlonale contro VE-caderina (Bender MedSystems). Per l'analisi del DNA, le cellule sono state fissate con etanolo al 70% e conservate a 4°C; dopo lavaggio per 2 volte con PBS, le cellule sono state colorate in 50 µg/ml di PI, RNAsi A (6.25 µg/ml), Nonidet P40 12.5 µl/ml per un'ora a temperatura ambiente al buio, e sottoposte a citofluorimetria mediante FACScan. L'analisi è stata determinata mediante software ModFit (Verità Software House).

Abbiamo estratto l'RNA totale da 8 carcinomi endometriali primitivi, 2 tessuti endometriali normali e 2 tumori benigni endometriali. Abbiamo utilizzato RNeasy Miny Kit (QIAGEN) partendo da tessuti che venivano omogeneizzati per 2 volte per 4 minuti a 30 HZ usando Mixer Mill MM 300 (Retsch) o da cellule omogeneizzate mediante agitazione in vortex per 30 secondi. La concentrazione totale di RNA di ciascun campione è stata misurata tramite spettrofotometria (Bechman Spectrophometer DU 640). I campioni di DNA venivano congelati a - 80°C fino all'analisi RT-PCR. 1µg di RNA totale veniva reverse trascritto con 25 unità della trascrittasi inversa Moloney murine leukaemia virus (PE Applied Biosystem) a 42°C per 30 minuti in presenza di esameri random. 2 µl di questi prodotti di cDNA venivano amplificati con 1 unità di AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystem) in presenza di specifici primer per 2 varianti di splice di PROM-1 (Yu Y et al, 2002). Per l'amplificazione di GAPDH abbiamo utilizzato i seguenti

primer: 5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGA-3' e 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' sintetizzati da m-Medical. Le reazioni venivano effettuate nel PTC-0200 DNA Engine (MJ Research) come descritto da Yu et al (Yu Y et al, 2002). I prodotti di PCR sono stati analizzati su un gel di agarosio al 3% e colorati con bromile di etidio (2% di agarosio di tipo II SIGMA + 1% di agarosio NU-SIEVE, SIGMA).

L'immunocolorazione è stata effettuata su 3 µm di sezioni di tessuto tumorale fissato in formalina e in blocchi di paraffina, e montate su vetrini con poli-l-lisina o su vetrini SuperFrost Plus ed essiccati a 37°C over-night. I vetrini venivano deparaffinizzati in Xylene e reidratati in modo convenzionale; la perossidasi endogena è stata bloccata con H₂O₂ al 3% per 5 minuti. Per ridurre i legami non specifici le sezioni sono state incubate con Normal Goat Serum al 20% per 30' a temperatura ambiente. Le cellule che esprimevano gli epitopi CD133-1 e CD133-2 sono state identificate dopo un'incubazione over-night a 4°C con anticorpi monoclonali anti CD133-1 (AC 133 Miltenyi Biotech, diluizione 1:50) e l'anticorpo monoclonale anti CD133-2 (293C3 Miltenyi Biotech, diluizione 1:50). Il rilevamento di CD 133-1 e di CD 133-2 è stato effettuato utilizzando il sistema anti-mouse EnVision System-HRP (DakoCytomation) per 30' a temperatura ambiente. Come cromogeno abbiamo utilizzato la diamminobenzidina (DAB Substrate

System, DAKO). Le sezioni sono state colorate con ematossilina, disidratate e pulite in xylene e successivamente lavorate con EUKIT.

La distribuzione degli epitopi CD133-1 e CD133-2 è stata analizzata secondo parametri clinico-patologici mediante il test non parametrico Wilcoxon rank sum.

Le singole sospensioni cellulari ottenute da dissociazione meccanica/enzimatica dei campioni tissutali tumorali sono state analizzate attraverso citofluorimetria per gli epitopi CD133-1 e CD133-2. La figura 1 mostra un esempio rappresentativo di analisi FACS di epitopo CD133-1 e CD133-2 ottenuti da carcinoma endometriale endometriode ben differenziato. I valori di purezza della popolazione cellulare CD133+ ottenuti dopo purificazione MACS variavano dall'84 al 90%.

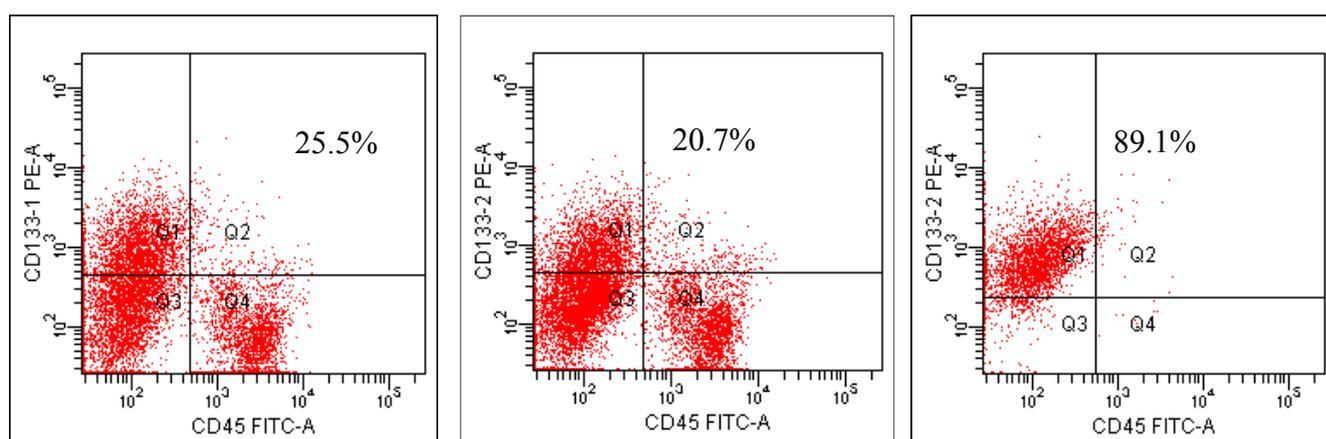


Figura 1 (A,B,C)

L'origine epiteliale delle cellule CD133+ è stata confermata dall'analisi di immunofluorescenza ottenuta con il metodo FACS con anticorpo

monoclonale anti-citocheratina-7, il quale contrassegnava positivamente la maggioranza delle cellule CD133+ purificate (Figura 1D).

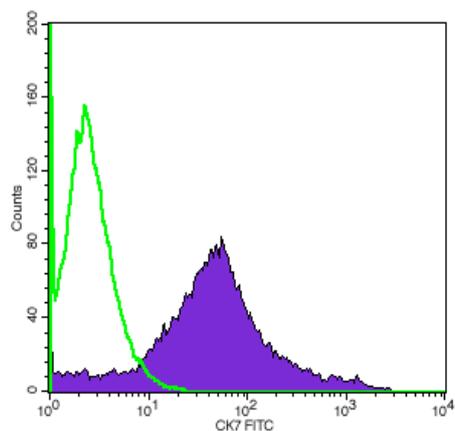


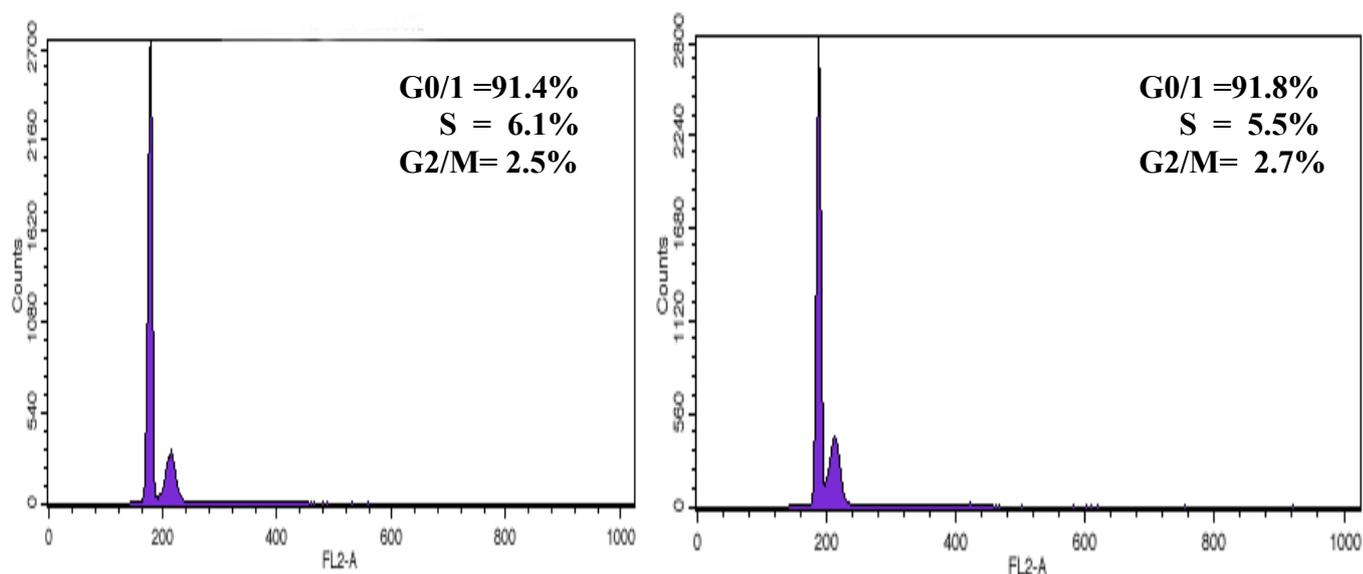
Figura 1 (D)

Inoltre, abbiamo dimostrato come la frazione di cellule endoteliali nella popolazione cellulare CD133+ purificata era sempre inferiore all'1%, come documentato dall'analisi FACS di VEGF R2 (KDR), CD105 e VE-caderina. Al fine di documentare la capacità delle cellule CD133+ a formare colonie, singole sospensioni cellulari sono state poste in piastre a 96 pozzetti in un saggio di diluizione. Le colonie erano formate molto più efficientemente da cellule CD133+, che davano luogo ad un numero di colonie 6.9 volte più ampio rispetto alla popolazione cellulare CD133- ($p= 0.029$) (Tabella 1).

	No.Colonies	% colonies	Fold-increase
CD 133+	7	14.6	6.9
CD 133-	1	2.1	1

Per dimostrare che le cellule CD133+ posseggono un'ampia attività proliferativa abbiamo esaminato le caratteristiche proliferative, nel mezzo di coltura, di cellule CD133+, ottenute da tumori endometriali primitivi.

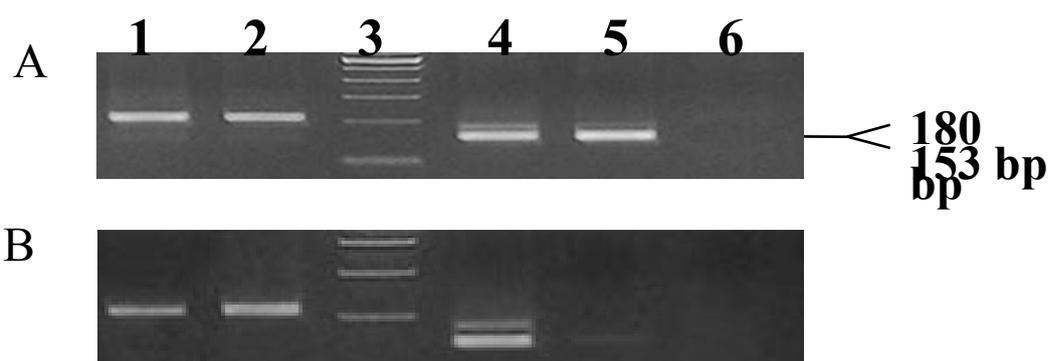
I dati indicano che le colture tumorali ottenute dalle cellule CD133+ avevano un maggiore potenziale proliferativo rispetto alle cellule CD133-. La quantificazione della percentuale di cellule CD133+ nelle stesse colture mostrava che la proporzione di cellule esprimenti CD133+ diminuiva con il tempo di coltura, sebbene il numero delle cellule in assoluto aumentava di 2.5 volte, rispetto al numero iniziale di cellule, suggerendo una capacità di auto-rinnovamento. Per valutare se la differenza nella capacità proliferativa delle cellule CD133+ e CD133- fosse dovuta ad una differenza nella distribuzione della fase del ciclo cellulare, abbiamo analizzato le popolazioni cellulari CD133+ e CD133- di 8 casi di carcinoma endometriale: non c'era differenza apparente in termini di distribuzione della fase del ciclo cellulare tra le due popolazioni (Figura 2).



Tutti i tumori esaminati risultavano aneuploidi; non c'era differenza nella ploidia tra cellule CD133+ e CD133- purificate dallo stesso campione tumorale.

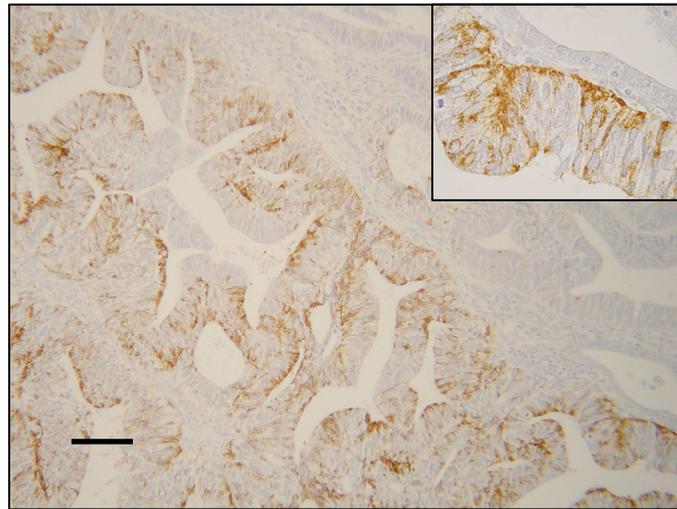
L'analisi RT-PCR semiquantitativa è stata condotta in 8 tumori endometriali, 2 tumori benigni, e 2 tessuti endometriali normali.

La fig.3 mostra un esempio rappresentativo di analisi RT-PCR semiquantitativa dell'espressione delle varianti di splice PROM-1 nel carcinoma endometriale e nel tessuto endometriale normale. La banda più bassa (MW=152bp) e la banda più alta (MW= 180 bp) corrispondono alle varianti PROM-1.s2 e PROM-1.s1. Le due bande erano chiaramente rilevabili nel cancro endometriale (Figura 3A) mentre la presenza della banda corrispondente a PROM-1. s2 era scarsamente valutabile nei tessuti normali (Figura 3B).



Risultati simili sono stati osservati in due casi di lesioni endometriali benigne. E' stato rilevato una specifica immunocolorazione per CD133-1 che è stata trovata in foci sparsi di cellule tumorali esprimenti una

immunoreazione specifica (Figura 4). Un simile pattern di immunocolorazione è stata trovata per gli epitopi CD133-2.



Abbiamo valutato la proporzione di cellule CD133+ in una serie di 21 carcinomi endometriali primitivi.

E' stato valutato un ampio range di cellule esprimenti CD133-1 in tutte le serie di cancro endometriale (range 0.1 - 42.2%, mediana 4.7%), mentre la percentuale di cellule esprimenti CD133-2 variava dallo 0.2 al 40% (mediana 3.6%). Non sembra, quindi, esserci una differenza nella distribuzione della percentuale di cellule CD133-1 e CD133-2 in accordo ai parametri clinico-patologici esaminati.

A completamento di questa ricerca ci è sembrato interessante estendere tale modello di cancerogenesi “staminale” in vivo. Per valutare l'attività tumorigenica la popolazione cellulare totale ottenuta dopo scissione

enzimatica delle biopsie di carcinoma dell'endometrio e le due popolazioni cellulari CD133+/-, verranno inoculate sottocute a diverse concentrazioni in topi NOD/SCID. Si procederà poi con la misurazione delle eventuali masse formati e verrà verificata l'origine delle stesse mediante reazione immunohistochimica. Questa seconda parte del progetto è in corso e siamo in attesa dei risultati.

¹ **EXPRESSION OF CD133-1 AND CD133-2 IN ENDOMETRIAL CANCER**

Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, Perillo A, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Martinelli E, Rutella S, Borriello M, Mancuso S, Scambia G.

Gynecologic Oncology Unit, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

² Immunohaematology and Transfusion Service, ASL Viterbo, Viterbo, Italy

³ Department of Haematology and Blood Transfusion, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

⁴ Department of Oncology, Catholic University of the Sacred Heart, Campobasso, Italy

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs) have been isolated in several solid tumors including prostate, breast, and ovarian cancer. Stem cells isolated from nervous system and prostate express the CD133 antigen, which is widely used to isolate hematopoietic stem and progenitor cells.

The aim of this study was to investigate the expression of CD133-1 and CD133-2 epitopes in a series of primary endometrial tumors, and to biologically characterize CD133⁺ endometrial cancer cells. Moreover, the distribution of CD133-1 and CD133-2 epitopes in CD133⁺ cells according to clinico-pathological parameters has been also analyzed.

FACS analysis enabled the selection of CD133⁺ cells, whose epithelial origin was confirmed by positive immunofluorescence with MoAb anti-cytokeratin 7. CD133⁺ cells gave rise to a 6.9-fold larger number of colonies than that documented in CD133⁻ population (p value=0.029). Moreover, CD133⁺ cells showed an enhanced proliferative potential with compared to CD133⁻ cells. A very wide range of CD133-1 and CD133-2 expressing cells are detected in endometrial tumors. We documented that CD133-1 and CD133-2 antigens may be useful in order to select and enrich the population of CD133 expressing endometrial tumor cells characterized by a higher clonogenic efficiency and proliferative potential. A larger series is needed to definitively prove that CD133⁺ cell fraction in endometrial tumors might have prognostic significance.

INTRODUCTION

Much attention has been recently focused on the role of cancer stem cells (CSCs) in the formation and progression of leukemias and solid malignancies (1,2). In particular, in the CSC model, only a small

proportion of cells in the tumor are proposed to be able to proliferate and self-renew extensively, thus sustaining tumor growth, while the bulk of tumor cell populations proceed to differentiate into heterogeneous tumor cells that become the phenotypic signature of the tumor (1-3).

CSCs have been isolated in several solid tumors including prostate, breast, lung, and ovarian cancer, as well as brain tumors, melanomas and osteosarcomas (4-11), on the basis of their clonogenic efficiency *in vitro* and ultimately tumorigenicity *in vivo* (5,6,8,10). However, the availability of peculiar antigenic profiles distinctive of tumor cells with stem cell properties would be of utmost importance to facilitate CSCs selection, with the aim of improving their biological characterization, and also exploiting potential target-based therapeutic strategies (1-3,12): indeed, hematopoietic stem cells have been reported to express MDR1 and ABC transporters, which are involved in drug resistance, and demonstrated to be less sensitive to certain cytotoxic drugs than the more committed progenitor cells (13-15). Moreover, in multiple myeloma, the minority clonogenic CD138- blood cells express CD20 and when exposed to rituximab, an antibody against CD20, clonogenicity was markedly reduced (16).

Stem cells isolated from normal and neoplastic central nervous system and prostate express the CD133 antigen (4,9,17,18) coded by the CD133 gene (Prom-1 gene).

In particular, CD133 gene codes 2 splice variants named Prom-1.s1 and Prom-1.s2, and the protein product is recognized by three different antibodies directed toward different epitopes (CD133-1 and CD133-2) (19,20). Although little is known about the biological functions of the two CD133 splice variants, it has been speculated that they could play a role in cell-cell interactions and be differently involved in fetal development and mature organ homeostasis (19,20).

Human endometrium is one of the most actively regenerating normal tissues and this observation led to hypothesize the existence of endometrial stem cells (21). Similarly to other highly renewing tissues, such as intestine, skin, and bone marrow, where adult stem cells have been identified (22), putative stem cell activity represented by cell clonogenicity has been recently documented in human endometrial epithelial and also stromal cells (23,24).

To the best of our knowledge, no data about the presence of CD133-1 and CD133-2 epitopes and Prom-1.s1/Prom1.s2 mRNA has been reported until now in endometrial carcinoma.

The aim of this study was to investigate the expression of CD133-1 and CD133-2 in a series of primary endometrial tumors, and to biologically characterize CD133⁺ endometrial cancer cells. Moreover, the

distribution of CD133-1 and CD133-2 epitopes in CD133⁺ cells according to clinico-pathological parameters has been also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Tissue collection, isolation and culture of CD133 expressing cells in endometrial cancer

Tumor tissue specimens were obtained at time of primary surgery from 21 primary endometrial carcinoma patients. Moreover, 2 normal endometrial tissues from post-menopausal women undergoing surgery for uterine prolapse, and 2 benign endometrial lesions (simple hyperplasia) were also collected. Written informed consent to tumor tissue collection and use for isolation of tumor stem cells according to the protocol approved by the local Ethical Committee, was obtained by each patient.

At time of tissue collection the tumor specimen was cut in two halves: one half was used to confirm final pathological diagnosis, and the second half was used for isolation, purification and culture of CD133⁺ cells. Within 30 min since surgery, tumors were mechanically and enzymatically dissociated with Trypsin-EDTA (GIBCO) for 15 min, and then with Collagenase I (1 mg/ml) for 3 h at 37 °C (25).

After washing with PBS, tissues were incubated with Ammonium Chloride solution (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) for 10 min at 4°C in order to eliminate red cells. Negative sorting for CD45⁺ cells was performed in order to remove hematopoietic cell contaminants by using CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD133⁺ and CD133⁻ cells were obtained from single cell suspensions using CD133 Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) with AutoMACS according to the manufacturer's instructions. CD133-2 phycoerythrin (PE) was used to evaluate the efficiency of magnetic separation by flow cytometry. CD133⁺ and CD133⁻ sorted cell populations were resuspended in RPMI1640 supplemented with 10% FBS and used for limiting dilution and cell proliferation assay.

For limiting dilution assay, which was conducted as previously described (26) with minor modifications, CD133⁺ and CD133⁻ cells were plated in 96-well microwell plates in 100 µL of MyeloCult H5100 (StemCell Technologies) supplemented with hydrocortisone 10⁻⁶ M. Final cell density was 1 cell/well. Cell cultures were fed 100 µl MyeloCult H5100 every day until day 14 when colonies (composed each one of more than 30 cells) were counted and expressed as the percentage of the number of wells plated. Cell proliferation assay was performed plating CD133⁺ and CD133⁻ cells in T25 flasks with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, at a density of 90,000 cells/ml. Cell counts were performed on days 6 and 12

by using a Neubauer Counting chamber. Cell viability was determined by Trypan Blue cell exclusion method.

Flow cytometry and immunofluorescence analysis of CD133-1 and CD133-2 epitopes

Determination of CD133⁺ cells was performed according to Yin et al. (19), with minor modifications. Cells were incubated for 10 min in the dark at 4°C with FcR Blocking reagent (Miltenyi Biotech) and the following monoclonal antibodies: CD133-1 PE, CD133-2 PE (Miltenyi Biotech) and CD45 FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA) followed by incubation with 20 µg/ml 7-AAD for 10 min at room temperature in the dark. Conjugated, isotype-matched monoclonal antibodies were used to establish background fluorescence. Cells were run through a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an argon laser emitting at 488 nm. FITC and PE signals were collected at 530 and 575 nm respectively; spectral overlap was minimized by electronic compensation with Calibrite beads (Becton Dickinson) before each determination. A minimum of 10,000 events was collected and acquired in list mode using the CellQuest software (Becton Dickinson).

In order to confirm the epithelial nature of purified CD133⁺ cells, the expression of Cytokeratin 7 was measured by fixing CD133⁺ cells with Fix and Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) followed by incubation for 1 h at 4°C with monoclonal anti-human Cytokeratin 7 antibody (DakoCytomation, Carpinteria, CA); an anti-mouse FITC antibody (Dako Cytomation) was used as secondary antibody (27). The monoclonal antibodies against VEGF R2 (KDR) (clone 89106, R&D Systems, Abingdon, UK) and CD105 (clone SN6, Serotec, Oxford, UK), and the polyclonal antibody against VE-cadherin (Bender MedSystems, Vienna, Austria) were used to investigate the presence of endothelial cells in the purified CD133⁺ cell preparations.

For DNA content analysis, cells were fixed with ice-cold 70% ethanol and stored at 4°C; after washing twice with PBS, cells were stained in PI 50 µg/ml, RNase A (6.25 µg/ml), Nonidet P40 12.5 µl/ml for 1 h at room temperature in the dark, and run on a FACScan flow cytometer. Analysis was performed using ModFit software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

RT-PCR studies

Total RNA from 8 primary endometrial carcinomas, 2 normal endometrial tissues and 2 benign endometrial tumors. was extracted using RNeasy Miny Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the

manufacturer's protocol from tissues homogenized twice for 4 min at 30 Hz using Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), or from cells homogenized by vortexing for 30 sec. The RNA concentration of each sample was measured by spectrophotometry (Beckman spectrophotometer DU640, Palo Alto California, USA). The RNA samples were frozen at -80°C until RT-PCR analysis. One µg of total RNA were reverse transcribed with 25 U of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (PE Applied Biosystem, Foster City, CA) at 42°C for 30 min in the presence of random hexamers. Two µl of this cDNA products were amplified with 1 U of AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystem) in the presence of primers specific for the two Prom-1 splice variants (for primer sequence see ref. 20). For the amplification of GAPDH the following primers were used: 5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGA-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' synthesized by m-Medical (Florence, Italy). Reactions were conducted in the PTC-0200 DNA Engine (MJ RESEARCH, Waltham, MA, USA), as described by Yu et al (20). The PCR products were analyzed on 3% agarose gel stained with ethidium bromide (2% agarose type 2 SIGMA + 1% Agarose NU-SIEVE, SIGMA, Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Immunohistochemistry

Immunostaining was performed on 3 µm formalin fixed, paraffin-embedded cancer tissue sections, mounted on poly-l-lysine-coated slides or SuperFrost Plus microscope Slides, and dried at 37°C overnight. Then the slides were deparaffinized in xylene and rehydrated conventionally; the endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 5 min. To reduce non specific binding the sections were incubated with 20% normal goat serum for 30 min at room temperature. Cells expressing CD133-1 and CD133-2 epitopes were identified after overnight incubation at 4°C by using the monoclonal mouse anti-CD133-1 antibody (clone AC133 Miltenyi Biotec) (1:50 dilution) and the monoclonal anti-CD133-2 antibody (clone 293C3 Miltenyi Biotec) (1:50 dilution). CD133-1 and CD133-2 detection was performed by using anti-mouse EnVision System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), for 30 min at room temperature. Diaminobenzidine was used as a chromogen (DAB substrate System, DAKO). Sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated and cleared in xylene, and then mounted with EUKIT.

Statistical methods

The distribution of CD133-1 and CD133-2 epitopes according to clinico-pathological parameters was analyzed by Wilcoxon rank sum non parametric test.

RESULTS

Isolation and *in vitro* proliferation of CD133 expressing cells

The single cell suspensions derived from mechanical/enzymatic dissociation of tumour tissue specimens were analyzed by flow cytometry for CD133-1 and CD133-2 epitopes. Figure 1 shows a representative example of FACS analysis of CD133-1 and CD133-2 epitopes from a primary endometrioid well differentiated endometrial carcinoma. The values of CD133⁺ cell population purity after MACS purification ranged from 84% to 90%. The epithelial origin of sorted CD133⁺ cells was confirmed by FACS-based immunofluorescence analysis with MoAb anti-cytokeratin 7, which positively stained the vast majority of purified CD133⁺ cells, as shown in the representative example in Figure 1D. Moreover, we found that the fraction of endothelial cells in purified CD133⁺ cell population was always less than 1%, as documented by FACS analysis of VEGF R2 (KDR), CD105, and VE-cadherin (data not shown).

In order to document the ability of CD133⁺ cells to form colonies, single cell suspensions were plated in 96-well plates in the limiting dilution assay. As shown in Table 1, colonies were formed much more efficiently by CD133⁺ cells, which gave rise to a 6.9-fold larger number of colonies than that documented in CD133⁻ population (p value=0.029).

To show whether CD133⁺ cells were capable of extensive proliferation (e.g. generating progeny several orders of magnitude higher than the starting population) we looked at the proliferative properties of CD133⁺ cells in liquid culture established from primary endometrial tumors (Figure 2). The data indicate that tumor cultures derived from CD133⁺ cells have an enhanced proliferative potential (Figure 2A) with respect to CD133⁻ cells (Figure 2B). Quantitation of the percentage of CD133⁺ cells in the same cultures showed that the proportion of CD133-expressing cells diminished with time of culture (Figure 2A), even though the absolute cell number increased of 2.5 folds, as compared to initial number of cells, suggesting capacity of self-renewing. To evaluate whether the difference in the clonogenic efficiency and proliferation of CD133⁺ and CD133⁻ was due to differences in cell cycle phase distribution, we analyzed the sorted CD133⁺ and CD133⁻ cell populations from 8 cases of endometrial carcinomas: there was no apparent difference in terms of cell cycle phase distribution between the two populations, as shown in the representative example in

Figure 3. All tumors examined resulted aneuploid: there was no difference in the ploidy between CD133⁺ and CD133⁻ cells purified from the same tumor sample (data not shown).

RT-PCR and immunohistochemical data

Semiquantitative RT-PCR analysis was conducted in 8 endometrial tumors, 2 benign endometrial tumors, and 2 normal endometrial tissues. Figure 4 shows a representative example of semiquantitative RT-PCR analysis of PROM-1 splice variants expression in endometrial cancer, and normal endometrial tissues. The lower band (MW=153 bp) band, and the upper band (MW=180 bp) correspond to the Prom-1.s2 and Prom-1.s1 variants, respectively.

The two bands were clearly detectable in endometrial cancer (Figure 4A), while the presence of the band corresponding to Prom-1.s2 was barely detectable in normal tissue (Figure 4B)

Similar findings were observed in 2 cases of benign endometrial lesions (data not shown).

Specific immunostaining for CD133-1 was detected in scattered foci of tumor cells exhibiting specific immunoreaction (Figure 5). A similar pattern of immunostaining was found for CD133-2 epitope (data not shown).

Percentages of cells expressing CD133-1 and CD133-2 epitopes in primary endometrial carcinomas

We determined the proportion of CD133-expressing cells in a series of 21 primary endometrial carcinomas (Table 2). A wide range of cells expressing CD133-1 were detected in the whole series of endometrial cancer (range 0.1-42.2%, median=4.7%), while the percentage of CD133-2 expressing cells ranged from 0.2 to 40.0 % (median=3.6 There seems not to be any difference in the distribution of the percentage of CD133-1 and CD133-2 expressing cells according to the clinico-pathological parameters examined (see Table 2).

DISCUSSION

The CD133 antigen has been used to isolate and enrich cell populations showing *in vitro* clonogenicity and/or *in vivo* tumorigenicity in prostate and nervous system tissues (4,9,17,18), as well as in endothelial and hematopoietic tissues (19,28,29).

We reported for the first time the presence of CD133-1 and CD133-2 epitopes and the expression of Prom-1.s1 and Prom-1.s2 mRNA in tumor cells in primary endometrial tumors.

The vast majority of CD133⁺ cells reacted with monoclonal antibody against cytokeratin 7, which confirmed the epithelial origin of sorted cells.

CD133⁺ endometrial tumor cells exhibited a higher clonogenic efficiency and more extensive proliferative potential with respect to CD133⁻ cells, as also previously reported (4,9).

A peculiar feature of CD133 antigen, which is considered a marker of undifferentiated cells, is the down-regulation at confluence in culture or upon differentiating stimuli, which proceeds along with the acquisition of molecular and/or morphologic characteristics of differentiation (4,9,13,29,30). Indeed, we also showed that the percentage of CD133 expressing cells diminished with time of culture, while their absolute number increased, thus sustaining their self-renewing ability.

The proportion of CD133⁺ cells in our series of endometrial tumors resulted higher than the values reported in prostate cancer (4), but quite comparable to those observed in pediatric brain tumors (9). Even though it cannot be excluded that the expression of CD133 antigen not only in stem cells but also in committed progenitors downstream in the tumor cell hierarchy from CSCs, could contribute to this variability, tissue specificity has also to be taken into account (31). In this context, it is worth noting that the percentages of CD133-1 and CD133-2 expressing cells in endometrial carcinomas resulted significantly higher with respect to ovarian tumors (manuscript submitted).

It has been hypothesized that the CSCs content in a tumor may correlate with more aggressive clinicopathological features and outcome (1): for instance the percentage of clonogenic cells was reported to be higher in pediatric medulloblastomas with respect to pilocytic astrocytoma (9). On the other hand, we failed to find any relationship between the fraction of CD133-1 or CD133-2 expressing cells and grade of differentiation, as also observed by Collins et al (4) in prostate carcinomas.

In conclusion, we documented that CD133-1 and CD133-2 may be useful in order to select and enrich the population of CD133 expressing endometrial tumor cells, which are characterized by a higher clonogenic efficiency and proliferative potential. The potential prognostic role of the assessment of CD133 antigen expression in endometrial tumors needs to be investigated in a larger series.

Discussione

Le differenti modalità terapeutiche adottate per il trattamento del carcinoma dell'endometrio hanno condotto a risultati prognostici significativi, testimoniati da tassi di sopravvivenza assoluta che raggiungono l'80% (Creutzberg C.L. et al., 2000), ma che sfiorano percentuali anche più elevate negli stadi I e II (Grundsell H. et al., 1980). Sembra, tuttavia, che nelle ultime decadi né i progressi diagnostici conseguiti, né gli aggiustamenti terapeutici proposti, abbiano potuto ulteriormente modificare la prognosi di queste pazienti, che resta, più o meno stabilmente, ancorata ai valori registrati già agli inizi degli anni '80 (Creutzberg C.L. et al., 2000).

E' opinione diffusa che la possibilità di migliorare i risultati finora raggiunti, possa consistere nell'identificazione di parametri prognostici oggettivi e riproducibili, che consentano una più spinta individualizzazione dei protocolli terapeutici e, quindi, il superamento del costante dualismo concettuale che, attualmente, ne compromette la validità. In assenza di un'adeguata stratificazione prognostica delle pazienti, le terapie moderne sono vincolate alla necessità di garantire un trattamento che sia genericamente adeguato alla potenziale aggressività della neoplasia e contemporaneamente, il più possibile scevro da effetti collaterali gravi.

Un precoce riconoscimento dei casi di cancro endometriale ad “alto” e a “basso” rischio, renderebbe possibile una programmazione terapeutica personalizzata, che preveda protocolli sufficientemente intensivi per pazienti con neoplasie aggressive, sottraendo, al contrario, pazienti con buona prognosi a trattamenti addizionali non necessari, spesso gravati da una rilevante incidenza di severi effetti collaterali (Morrow C.P. et al., 1991; Zaino E. et al., 1996). E’ per tale motivo che la nostra attenzione si è rivolta all’identificazione di nuovi fattori prognostici attraverso lo studio delle cellule staminali e del sistema endocannabinoide.

Abbiamo riportato, per la prima volta in letteratura, l’espressione degli epitopi CD133-1 e CD133-2 e dell’ mRNA PROM-1.s1 e PROM-1.s2 nelle cellule tumorali di carcinomi endometriali primitivi. Le cellule tumorali endometriali CD133+ hanno mostrato una più alta efficienza clonogenica ed un maggiore potenziale proliferativo rispetto alle cellule CD133-.

Una peculiare caratteristica dell’antigene CD133, che è considerato un marker di indifferenziazione cellulare, è la down-regulation a confluenza nelle colture o sotto stimoli di differenziazione, che mostrano un’acquisizione di caratteristiche molecolari e/o morfologiche di differenziazione (Collins A.T. et al., 2005; Singh S.K. et al., 2003; Chaudhary P.M. et al., 1991; Rafii S., 2000; Corbeil D. et al., 2000).

In conclusione abbiamo documentato che il CD 133-1 e il CD 133-2 possono essere utilizzati per selezionare e caratterizzare la popolazione di cellule di tumore endometriale che esprimono il CD 133, caratterizzato da un alto potenziale proliferativo e clonogenico. Il ruolo prognostico dell'espressione dell'antigene CD 133 nel tumore endometriale deve quindi essere ancora avvalorato ma potrebbe essere utilizzato come fattore prognostico negativo. Infatti l'espressione dell'antigene CD 133 potrebbe essere indice di una maggiore aggressività biologica.

Il possibile uso terapeutico dei principi attivi della *Cannabis* è noto da tempo. L'uso della *Cannabis sativa* a scopo ricreativo e medicinale risale al 2600 a.C., quando l'imperatore cinese Huang Ti la raccomandava per “disturbi femminili, gotta, reumatismo, malaria, stipsi e debolezza mentale”. Ma si tratta di una medicina da usare con cautela, come avverte il compilatore, in quanto una dose eccessiva “fa vedere demoni”.

Dal 1840 al 1937, furono pubblicati più di 100 articoli sull'uso della *Cannabis*. Fu ufficialmente riconosciuta come potenziale risorsa terapeutica, nel 19° secolo d.C., quando in Inghilterra fu considerato uno dei più validi medicinali contro dolori cronici, costipazioni, convulsioni, glaucoma e nausea. L'attività farmacologica dei cannabinoidi e dei loro derivati, ci portano a prevedere uno sviluppo di nuovi medicinali, per il trattamento di

malattie nervose e immunitarie, per problemi cardiovascolari, ansia, infiammazione e cancro.

Gli endocannabinoidi sono prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche, esercitando azione anti-ossidativa, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica (Calignano et al., 1998). Inoltre, come abbiamo già notato, la distribuzione dei recettori dei cannabinoidi nel cervello (Herkenham et al., 1995) suggerisce per gli endocannabinoidi anche un ruolo fisiologico nel controllo del movimento e della percezione, nell'inibizione dei processi di apprendimento e memoria, nel rafforzamento dell'azione degli oppioidi, nonché nella regolazione di stati emotivi quali il piacere e l'aggressività. È possibile ipotizzare per tali molecole una funzione "anti-stress" simile e complementare a quella esercitata dalle endorfine sia a livello "centrale" che periferico (Di Marzo et al., 1998). Infine, studi più recenti stanno approfondendo un possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel controllo della proliferazione di cellule tumorali (De Petrocellis et al., 1998; Ligresti et al., 2003). Noi crediamo che la selettiva espressione dei recettori CB2 nelle cellule endometriali neoplastiche possa giocare un importante ruolo nell'evoluzione del carcinoma endometriale. Infatti, il sistema degli endocannabinoidi controlla la decisione di sopravvivenza/morte cellulare mediante l'inibizione o la stimolazione della crescita cellulare. I

cannabinoidi producono i loro effetti mediante la modulazione di diversi importanti meccanismi intracellulari, quali la cascata delle protein chinasi attivate dallo stress e dalla mitosi (ERK, JNK, p38), la liberazione di Wnt/beta catenina o generazione di ceramide, che giocano tutte un ruolo chiave nel destino cellulare. Grazie alla loro partecipazione nella regolazione del ciclo cellulare, la stimolazione dei recettori dei cannabinoidi ha condotto ad un forte effetto antitumorale sia in vitro, nelle cellule C6 di glioma di topo e nelle linee cellulari umane di tumore del polmone non a piccole cellule, che in vivo, nel carcinoma del polmone del topo, nell'epitelioma tiroideo, nel carcinoma della mammella e del colon-retto, nel melanoma e nei gliomi. E' possibile ipotizzare che le cellule tumorali provano a rispondere alla trasformazione maligna mediante l'espressione dei recettori CB2 e, nello stesso tempo, aumentando i livelli di 2-AG mediante l'inibizione della sua degradazione mediata da MAGL. Quindi, gli agonisti selettivi dei recettori CB2, che sono privi degli effetti psicotropi tipici degli agonisti del recettore CB1, potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi composti anti-tumorali contro il carcinoma endometriale poiché possono distruggere le cellule tumorali possibilmente senza interessare la controparte non-trasformata. Inoltre, l'espressione specifica dei recettori CB2 solo sulle cellule trasformate potrebbe rappresentare un nuovo marker per la diagnosi del carcinoma endometriale. Nuove tecniche biomolecolari e

immunoistochimiche sono in studio per l'identificazione di nuovi, più specifici fattori prognostici che possono correlarsi al processo neoplastico. I nostri risultati suggeriscono un potenziale ruolo dei recettori CB2 nel controllo endogeno del carcinoma endometriale ed il loro possibile uso come nuovi fattori prognostici e soprattutto come nuovo target per lo sviluppo di chemioterapici che possono essere usati da soli o in associazione ad altri farmaci contro questo tipo di tumore.

Indubbiamente, ancora numerosi sforzi saranno necessari per individuare il ruolo fisiopatologico degli endocannabinoidi. Dal successo di tali sforzi dipenderà anche il possibile sviluppo di nuovi farmaci. Il disegno di nuove molecole con attività selettiva per il recettore CB2, o di sostanze che non siano in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica, potrebbe consentire l'ottenimento di farmaci privi degli indesiderati effetti psicotropi della *Cannabis*.

L'opinione sociale, infatti, e le implicazioni legali rendono complicato il solo immaginare una prescrizione medica di marijuana. Intorno alla marijuana, in particolare nel nostro paese, è stato allestito e riprodotto il rituale proprio di un tabù (...nonostante le lotte dei radicali!....). Nei confronti della marijuana esiste, pertanto, a seguito di un uso politico e strumentale della pseudoscienza, un pregiudizio negativo, che ostacola qualunque familiarità

con la sostanza e impedisce un approccio pragmatico, non ideologico e non moralistico.

BIBLIORAFIA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cancer. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, Inc., 1994:1255-94
- Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M et al. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:43-47
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Acad Sci USA* 2003;100:3983-3988
- Alison MR, Poulson R, Forbes S et al. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002;197:419-423
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2005) Endometrial cancer. *Lancet* 366:491-505
- Ambros RA, Sherman Me, Zahn CM, Bitterman P, Kurman RJ. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hun Pathol* 1995;26:1260-7
- Arreaza G., Devane W.A., Omeir R.L., Sajani G., Kunz J., Cravatt B.F. and Deutsch D.G. The cloned hydrolytic enzyme responsible for the breakdown of anandamide also catalyzes its formation via the

condensation of arachidonic acid and ethanolamine.

Neurosci.Lett.1997;234:59-62

- Bach D., Razz A., and Goldman R. The effect of hashish compounds of phospholipids phase transition. *Biochim.Biophys. Acta.* 1976;436:889-894
- Bamberger AM, Bamberger CM, Schulte HM. Molecular mechanism of proliferation in endometrial tumor cells. *Human reprod Update* 1998;4:526-31
- Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behaviour of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65(8):3025-3029
- Barakat RR, Grigsby PW, Sabatini P, Zaino RS. Corpus epithelial tumors. In: Hoskins WJ, Perez LA, Young RC et al. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology.* III ediz. Philadelphia: Lippicott Raven 2000:919-59
- Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S.Y., Makriyannis A. and Piomelli D.; *Science* 277 (1997) 1094-1097
- Berchuck A, Boyd J. Molecular basis of endometrial cancer. *Cancer* 1995;76:2034-40
- Bhatia M. AC 133 expression in human stem cells. *Leukemia* 2001;15(11):1685-1688

- Bifulco M, Di Marzo V (2002) Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med* 8:547-50
- Bifulco M, Laezza C, Gazerro P, Pentimalli F (2007) Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion. *Oncol Rep* 17:813-6
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81:224-38
- Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J.A., Fernandez-Ruiz J.J. and Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implication for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;256:377-380
- Bisogno T., Delton-Vandenbroucke I., Milone A., Lagarde M., and Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;370:300-307
- Bisogno T., Maurelli S., Melck D., De Petrocellis L., Di Marzo V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:3315-23

- Bixby S, Kruker GM, Mosher JT et al. Cell intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 2002;35:643-656
- Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M (2006) Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 20:2633-5
- Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Morente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M (2008) Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res* 68:1945-52
- Bloch E, Thyssen B, Morrill GA, Gardner E, Fujimoto G (1978) Effects of cannabinoids on reproduction and development. *Vitam Horm* 36:203-58
- Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;15:10-7
- Bouabula M., Bourrie B., Rinaldi-Carmona M. et al.; *J. Biol. Chem.* 270 (1995) (b) 13973-13980
- Bouabula M., Poinot-Chazel C., Bourrie B. et al.; *Biochem J.* 312 (1995) (a) 637-641

- Breivogel C.S., Griffin G., Di Marzo V. and Martin B.R. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60:155-163
- Burkey T.H., Quock R.M., Consroe P., Ehlert F.J., Hosohata Y., Roeske W.R., Yamamura H.I. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 1997;336:295-298
- Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in spradic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996;148:1671-8
- Calignano A., La Rana G., Giuffrida A., Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, (1998) 394:277-28
- Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR (1998) Hippocampal neurotoxicity of Delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Neurosci* 18:5322-32
- Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 2004;70(6):1738-1750
- Chaudhary PM, Robinson IB. Expression and activity of p-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66:85-94

- Chhieng DC, Ross JS, Ambros RA. Bcl-2 expression and p53 in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9:402-6
- Clarke MF. Neurobiology at the root of brain cancer. *Nature* 2004;432:281-282
- Collins AT, Berry PA, Hyde C et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65(23):10946-10951
- Collins AT, Habib FK, Maitland NJ et al. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha2 beta1-integrin expression. *J Cell Science* 2001;114:3865-3872
- Corbeil D, Roper K, Hellwig A et al. The human AC 133 antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000;275:5512-5520
- Costello RT, Mallet F, Gaugler B et al. Human acute myelocytic leukaemia CD34+/CD38p progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000;60:4403-4411
- Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Warlam-Rodenhuis CC et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-I endometrial carcinoma:

multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma. *Lancet* 2000;355:1404-11

- Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol.* 2005;166:3-18
- Das S.K., Paria B.C., Chakraborty I. and Dey S.K. Cannabinoid ligand-receptor signalling in the mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:4332-4336
- De Petrocellis L., Melck D., Palmisano A., Bisogno T., Laezza C., Bifulco M., Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1998) 95:8375-8380
- Dechaud H, Maudelonde T, Daures JP, Rossi JF, Hedon B. Evaluation of endometrial inflammation by quantification of macrophages, T lymphocytes, and interleukin-1 and -6 in human endometrium. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15:612-8
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-82

- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: new targets for drug development. *Curr Pharm Des.* 2000;6:1361-80
- Di Marzo V, Petrosino S (2007) Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 18:129-40
- Di Marzo V., Bisogno T., Sugura T., Melck D., De Petrocellis L.; *Biochem. J.* 331 (1998) 15-19
- Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J.C. and Piomelli D. *Nature* 372 (1994) 686-691
- Di Marzo V., Grasso S. *Cannabis e cannabinoidi Erba medica stampa alternativa* 2002; pp. 46-60
- Di Marzo V., Hill M.P., Bisogno T., Crossman A.R. and Brotchie J.M. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in a animal model of Parkinson's disease *FASEB J.* 2000; 14:1432-1438
- Di Rosa M, Ialenti A, Iannaro A, Sautebin L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*1996;54:229-38
- Dinh T.P., Freund T.F. and Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem. Phys. Lipids* 2002;121:149-158

- Disep B, Innes BA, Cochrane HR, Titani S, Bulmer JN. Immunohistochemical characterization of endometrial leucocytes in endometritis. *Histopathology* 2004;45:625-32
- Doherty JA, Cushing-Haugen KL, Saltzman BS, Voigt LF, Hill DA, Beresford SA, Chen C, Weiss NS (2007) Long-term use of postmenopausal estrogen and progestin hormone therapies and the risk of endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 197:139:1-7
- Dore R, Moro G, D'Andrea F, La Fianza A, Franchi M, Bolis PF. CT evaluation of myometrium invasion in endometrial carcinoma. *J Comput Assist Tomogr* 1987;11:282-9
- Dove Pettit D.A., Harrison M.P., Olson J.M., Spencer R.F. and Cabral G.A. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosc. Research.* 1998; 51:391-402
- Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Tsao JL, Shibata DK. Early mutational activation of the c-Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:1604-7
- Ehrlich CE, Young PC, Stehman FB, Sutton GP, Alford WM. Steroid receptors and clinical outcome in patients with adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:796-807

- Ellis CN, Burnette JJ, Sedeak R et al. Prognostic applications of DNA analysis in solid malignant lesion in tumors. *Surg Gynecol Obstet* 1991;173:329-42
- Esposito G, Ligresti A, Izzo AA, Bisogno T, Ruvo M, Di Rosa M, Di Marzo V, Iuvone T. The endocannabinoid system protects rat glioma cells against HIV-1 Tat protein-induced cytotoxicity. Mechanism and regulation. *J Biol Chem.* 2002;277:50348-54
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005;(65)20:9328-9337
- Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M. et al.; *Mol. Pharmacol.* 48 (1995) 443-449
- Felder C.C., Nielsen A., Briley E.M., Palkovits M., Priller J., Axelrod J., Nguyen D.N., Richardson J.M., Riggins R.M., Koppel G.A., Paul S.M. and Becker G.W. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in the brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 1996;393:231-235
- Fezza F., Bisogno T., Minassi A., Appendino G, Mechoulam R., Di Marzo V.; *FEBS Lett.* 513 (2002) 294-298
- FIGO stages, 1988 revision. *Gynecol Oncol* 1989;35:125-7

- Flygare J, Sander B (2007) The endocannabinoid system in cancer- Potential therapeutic target? *Semin Cancer Biol*
- Gargett CE. Stem cells in gynecology, *Aust N Z J Obstet Gynecol* 2004;44:380-386
- Gerard C.M., Mollerau C., Vassart G. and Parmentier M. Molecular cloning of human cannabinoid receptor, which is also expressed in testis. *Biochem. J.* 1991;279:129-134
- Gonzales S, Mauriello-Romanazzi G, Berrendero F, Ramos JA, Franzoni MF, Fernández-Ruiz J (2000) Decreased cannabinoid CB1 receptor mRNA levels and immunoreactivity in pituitary hyperplasia induced by prolonged exposure to estrogens. *Pituitary* 3:221-6
- Grenman R, Burk D, Virolainen E. et al. Clonogenic cell assay for anchorage dependent squamous carcinoma cell lines using limiting dilution. *Int J Cancer* 44(1):131-136,1989
- Grundsell H, Henrikson H, Johnsson JE, Laurin J, Tropè C. Histological grading and treatment failures in carcinoma of the uterine body. *Annales Chirurgiae et Gynecologiae* 1980;69:65-9
- Guzmán M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-55
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* 95:175-84

- Hansen HS., Lauritzen L., Moesgaard B., Strand AM., Hansen HH. Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acetyethanolamines: proposed role in neurotoxicity. *Biochem Pharmacol.*, 1998;55:719-725
- Hansen HS., Moesgaard B., Hansen HH., Schousboe A. and Petersen G. Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. *Lipids* 1999;34S:S327-S330. Review
- Hanus L., Abuy-Lafi S., Fride E., Breuer A., Vogel Z., Shalev D., Kustanovich I. and Mechoulam R. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor-PNAS. 2001;98:3662-3665
- Herkenham M. In *Cannabinoid Receptors* (Pertwee RG, Academic Press) (1995) 145-166
- Hillard. C.J.;Edgemond, W.s.; Jarrahian, A. and Campbell, W.B.; *J. Neurochem.*69 (1997) 631-638
- Hohmann A.G. and Herkenham M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999;258:517-523

- Horwitz RI, Feinstein AR, Horwitz SM, Robboy SJ. Necropsy diagnosis of endometrial cancer and detection-bias in case control studies. *Lancet* 1981;2:66-8
- Howlett, AC; Barth, F.; Bonner, TI et al., *Pharmacol. Rew.* 54 (2002) 161-202
- Huang SM., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Togneto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu CJ., Miller JD., Davies SN., Geppetti P., Walzer JM., and Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc.Natl.Accad.Sci. USA* 2002;99:8400-8405
- Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O. Expression of E-cadherin in normal benign and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:76-80
- Ishac E.J., Jiang L., Lake K.D., Varga K., Abood M.E. and Kunos G. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *B.J.Pharmacol.* 1996;118:2023-2028
- Iuvone T, De Filippis D, Di Spiezio Sardo A, D'Amico A, Simonetti S, Sparice S, Esposito G, Bifulco G, Insabato L, Nappi C, Guida M (2008) Selective CB2 up-regulation in women affected by endometrial inflammation. *J Cell Mol Med* 12:661-670

- Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Bisogno T, Petrosino S, Scuderi C, Di Marzo V, Steardo L (2007) Endocannabinoid Research Group. Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro. *J Mol Med* 85:1379-92
- Iversen OE, Utaaker E, Skaarland E. DNA ploidy and steroid receptors as predictors of disease course in patients with endometrial carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;67:531-7
- Izzo A.A., Mascolo N. and Capasso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2001;1(6):597-603. Review
- Jacks T, Weinberg A. Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996;381:643-4
- Jacobsen M, Jacobsen A, Nedergaard L, Andersen JE, Nielsen K. Endometrial carcinomas flow cytometric DNA content and S-phase values. *Pathol Res Pract* 1997;193:283-90
- Jhala DN, Atkinson BF, Balsera GR. Role of DNA ploidy analysis in endometrial adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2001;5:267-73
- Kaleli S, Kosebay D, Bese T, Demirkiran F, Oz UA, Arvas M et al. A strong prognostic variable in endometrial carcinoma: flow cytometric S-phase fraction. *Cancer* 1997;79:944-51

- 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;121:823-35
- Klein T.W., Newton C. and Friedman H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol. Today* 1998; 19:373-381
- Koga D., Santa T., Fukushima T., Homma H. and Imai K. Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J. Chromatogr.B.* 1997;690:7-13
- Kondo S., Kondo H., Nakane S., Kodaka T., Tokumura A., Waku K. and Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist, identification as one of the major species of monoacylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+ dependent and independent mechanism. *FEBS Lett.* 1998;429:152-156
- Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen and progesterone receptor expression. *Hum Pathol* 1998;29:551-8

- Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, and Di Marzo V. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):677-87
- Lunn CA, Reich EP, Bober L (2006) Targeting the CB2 receptor for immune modulation. *Expert Opin Ther Targets* 10:653-63
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, siracusa G, Finazzi-Agrò A (2000) Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem* 267:2991-7
- MacDonal ND, Salvesen HB, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ. Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res* 2000;60:1750-2
- Mackie K and Hille B., *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89 (1992) 3825-3829
- Makriyannis A., Pertwee R., Academic Press, London, 1995 87-115
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem.* 2005;95:437-45
- Martin RS., Luong LA., Welsh NJ., Eglen RM., Martin GR and MacLennan SJ. Effects of cannabinoid receptor agonist on neuronally-

evoked contractions of urinary bladder tissues isolated from rat, mouse, pig, dog, monkey, and human-br. *J. Pharmacol.*2000;129:1707-1715

- Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J, Di Marzo V. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur J Biochem.*2002;269:3771-8
- Matis I., Pochard P., Orlando P., Salzet M., Pestel J. and Di Marzo V. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur.J.Biochem.*2002;269:3771-3778
- Matsuda LA., SJ. Lolait, MJ. Brownstein, AC. Young and TI. Bonner. 1990. Structure of a cannabinoid receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61-5.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332-2336
- MatsushimaNishiu M, Unoki M, Ono K, Tsunoda S, Minaguchi T, Kuramoto H et al. Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN. *Cancer Res* 2001;61:3741-9
- Maudelonde T, Martinez P, Brouillet JP, Laffargue F, Pages A, Rochefort H. Cathepsin-D in human endometrium: induction by progesterone and potential value as a tumor marker. *J Clin Endoc Metab* 1990;70:115-21

- McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2002) Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 100:627-34
- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligunsky M., Kaninski NE., Scharz AR., Gopher A., Almog S., Martin BR., Compton DR., Pertwee RG., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., and Vogel Z. Identification of two serine residues involved in catalysis by fatty acid amide hydrolase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*1999;264:316-320
- Mikuta JJ. International Federation of Gynecology and Obstetrics staging of endometrial cancer 1988. *Cancer* 1993;71:1460-3
- Miturski R, Semczuk A, Tomaszewski J, Jakowicki J. Bcl-2 protein expression in endometrial carcinoma: the lack of correlation with p53. *Cancer Lett* 1998;133:63-9
- Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S, Garrett CT. Clinical implications of K-ras mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. *Cancer Res* 1992;52:2777-81
- Modugno F, Ness RB, Chen C, Weiss NS (2005) Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2840-7

- Molnar JJ, Poliak A. Recurrent endometrial malakoplakia. *Am J Clin Pathol*.1983;80:762-4
- Morrow CP, Bundy BN, Kurrow RJ, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I-II carcinoma of the endometrium: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 1991;40:55-65
- Munro S., KL. Thomas and M. Abu-Shaar. 1993. Molecular characterization of a Peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61-5.
- Murphy LJ, Gong Y, Murphy LC, Bhavnani B. Growth factors in normal and malignant uterine tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1991;622:383-91
- Nordstrom B, Strang P, Bergstrom R, Nilsson S, Tribukait B. A comparison of proliferation markers and their prognostic value for women with endometrial carcinoma. *Cancer* 1996; 78:1942-51
- Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2002;77:46-51
- Padykula HA. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann Y Acad Sci* 1991;622:47-56

- Pagotto U., Marsicano G., Fezza F., Theodoropoulou M., Grubler Y., Stalla J., Arzberger T., Milone A., Losa M., Di Marzo V., Lutz B. and Stalla GK. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J.Clin.Endocrinol:Metab.*2001,86:2687-2696
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Rev* 2003;3:895-902
- Parker Gibbs C, Kukekov VG, Reith JD et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 2005;7(11):967-976
- Patricelli MP., Lovato MA and Cravatt BF Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolase with distinct catalytic properties. *Biochemistry* 1999;38:9804-9812
- Peiro G, Lohse P, Mayr D, Diebold J. Insulin-like growth factor-I receptor and PTEN protein expression in endometrial carcinoma. Correlation with bax and bcl-2 expression, microsatellite instability status, and outcome. *Am J Clin Pathol* 2003;120(1):78-85

- Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168:1-51
- Pertwee RG. Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci.* 1999;65:597-605
- Pertwee RG. *Pharmacol. Ther.* 74 (1997) 129-180
- Pisani AL, Barbuto DA, Chen D, Ramos L, Lagasse LD, Karlan BY. HER-2/neu, p53 and DNA analysis as prognosticators for survival in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995;85:729-34
- Ponti D, Costa A, Zaffarano N, Pratesi G, Petrangolini G, Cordini D, Pilotti S, Pienotti MA, Dandone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65(13):5506-5511
- Porcella A., Maxia C., Gessa GL and Pani I. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *Eur.J. Neurosci.* 2000,12:1123-1127
- Poropatich C, Rojas M, Silverberg SG. Polymorphonuclear leucocytes in the endometrium during the normal menstrual cycle. *Int J Gynecol Pathol.* 1987;6:230-4
- Porter AC., Felder CC; *Pharmacol. Ther.* 90 (2001)45-60.

- Porter AC., Sauer JM., Knierman MD., Becker GW., Berna MJ., Bao J., Nomikos GG., Carter P., Bymaster FP., Leese AB., Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*2002;30:1020-1024
- Prat J (2004) Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathos* 35:649-62
- Preet A, Ganju RK, Groopman JE (2008) Delta 9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene* 27:339-46
- Pustztai L, Lewis CE, Lorenze J, McGee JO. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol* 1993;169:191-201
- Rafii S. Circulating endothelial precursors:mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000;105:17-19
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111
- Rice W., Shannon JM., Burton F. and Fiedeldey D. Expression of a brain-type cannabinoid receptor (CB1) in alveolar Type II cells in the lung: regulation by hydrocortisone. *Eur J.Pharmacol.*1997;327:227-232
- Richardson GD, Robson CN, Lang SH et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004;117:3539-3545

- Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC et al. PTEN mutations in endometrial cancers is associated with favourable clinical and pathologic characteristics. *Clin Cancer Res* 1998;4:3005-10
- Ross JD. What is endometritis and does it require treatment? *Sex Transm Infect.* 2004;80:252-3
- Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C (2005) Human sperm express cannabinoid receptor CB1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. *J Clin Endocrinol Metab* 90:984-91
- Saegusa M, Okayasu I. Bcl-2 is closely correlated with favourable prognostic factors and inversely with p53 protein accumulation in endometrial carcinomas: immunohistochemical and polymerase chain reaction/loss of heterozygosity findings. *J Cancer Res Clin* 1997; 123:429-34
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Identification of high-risk patients by assessment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998;42:2779-85
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Independent prognostic importance of microvessel density in endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1998;77:1140-4

- Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA et al. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2001;91:22-6
- Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Stokes AJ, Turner HJ. Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *Immunol.* 2003; 170:4953-62
- Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq V, Mukhtar V (2008) Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res* 68:339-42
- Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I (2000) Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett* 472:39-44
- Sato K, Mizuuchi H, Mori Y, Okamura N, Kudo R. Usefulness of CA 125 determination in the diagnosis of lymphnode metastasis in post menopausal uterine endometrial carcinoma. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1994;46:331-6
- Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G et al. Significance of epidermal growth factor receptor expression in primary human endometrial cancer. *Int J Cancer* 1994;56:26-30

- Scambia G, Gadducci A, Benedetti PL, Foti E, Federghini M, Ferrandina G et al. Combined use of CA 125 and Ca15-3 in patients with endometrial carcinoma. *Ginecol Oncol* 1994;54:292-7
- Schatz AR., Lee M., Condie RB., Puaski JT and Kaminski NE. Cannabinoid receptors CB1 e Cb2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*1997;142:278-287
- Schmid PC., Paria BC., Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1997) 94:4188-4192
- Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Med Path* 2000;13:295-308
- Silverberg SG, Mullen D, Faraci JA, Makowski EL, Miller A, Finch J et al. Endometrial carcinoma: clinical-pathologic comparison of cases in postmenopausal women receiving and not receiving estrogens. *Cancer* 1980;45:3018-26
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-5828

- Small-Howard AL, Shimoda LM, Adra CN, Turner H (2005) Anti-inflammatory potential of CB1-mediated cAMP elevation in mast cells. *Biochem J* 388:465-73
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15:356-62
- Stimpfl M, Schmid BC, Schiebel I et al. Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 1999;145:133-141
- Sugamata M, Ihara T, Uchiide I. Increase of activated mast cells in human endometriosis. *Am J Reprod Immunol.*2005;53:120-5
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) *Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand.* *Prog Lipid Res* 45:405-46
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Natane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A. and Waku K. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand brain *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89-97
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614-7

- Uchida N, Buck DW, He D et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000; USA 97(26):14720-14725
- Ueda N., Liu Q. and Yamanaka K. Marked activation of the N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phosphodiesterase by divalent cations. *Biochem Biophys. Acta.* 2001;1532:121-127
- Utaaker E, Iversen OE, Skaarland E. The distribution and prognostic implication of steroid receptors in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987;28:89-100
- van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998;51:716-24
- Vannacci A, Giannini L, Passani MB, Di Felice A, Pierpaoli S, Zagli G, Fantappie O, Mazzanti R, Masini E, Mannaioni PF. The endocannabinoid 2-arachidonylglycerol decreases the immunological activation of Guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311:256-64
- Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M (2004) Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology* 47:315-23

- Vogel HP, Mendelsohn G. Laminin immunostaining in hyperplastic, dysplastic and neoplastic lesions of the endometrium and uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1987;69:794-9
- von Minckwitz G, Kunh W, Kaufmann M, Heep J, Bastert G. Prognostic importance of DNA-Ploidy and S-phase fraction in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1994;7(4):250-6
- Wagenius G, Bergstrom R, Strang P, Gerdes U, Rogo K, Tribukait B et al. Prognostic significance of flow cytometric and clinical variables in endometrial adenocarcinoma stages I and II. *Anticancer Res* 1992;12:725-32
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*, (1997) 390:518-521
- Waleh NS, Cravatt BF, Apte-Deshpande A, Terao A, Kilduff TS (2002) Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* 291:203-10
- Walton RP, Li HL. *The Origin and Use of Cannabis in Eastern Asia: Their Linguistic-Cultural Implications*. 1975; pp.51-62
- Wang D, Konishi I, Koshiyama M, Mandai M, Nanbu Y, Ishikawa E, et al. Expression of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor

in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathologic and sex steroid receptor status. *Cancer* 1993;72:2628-37

- Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med*.1998;4:557-91
- Willoughby KA, Moore SF, Martin BR and Ellis E. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *J. Pharmacol.Exp.Ther.*1997,282:243-247
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et al. AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90(12):5002-5012
- Yu Y, Flint A, Dvorin EL et al. AC 133-2, a novel isoform of human Ac 133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 2002;277(23):20711-20716
- Zaino R, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. Pathologic models to predict outcome for women with endometrial carcinoma. *Cancer* 1996;77:1115-21
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. *Nat Med* 2001;7:1028-1034

**Lavori della Dott.ssa Maddalena Borriello prodotti durante il corso di
Dottorato di Ricerca "Riproduzione, Sviluppo e Accrescimento
dell'Uomo" XXI ciclo**

Lavori in extenso

1. Outpatient hysteroscopy emptying of a submucosal cystic lesion. Di Spiezio A., Guida M., Bifulco G., Frangini S., **Borriello M.**, Nappi C. JSLS 2007 Jan-Mar 11(1):136-7
2. Could office endometrial biopsy be accurate as EBHR for assessing the preoperative tumor grade? Bettocchi S., Di Spiezio A., Guida M., Bisulco G., **Borriello M.**, Nappi C. Eur J Surg Oncol. 2007 Mar 1
3. Isolated extra-pelvic endometriosis of the gluteal muscle. Guida M., Greco E., Di Spiezio A., **Borriello M.**, Morra I., Nappi C. JMIG (in press)
4. Ferrandina G., Bonanno G., Pierelli L., Perillo A., Propoli A., Mariotti A., Corallo M., Martinelli E., Rotella S., **Borriello M.**, Mancuso S., Scambia G. Expression of CD 133-1 and CD133-2 in Endometrial Cancer (submitted)
5. M. Guida, D. De Filippis, A. Ligresti, A. D'Amico, A. Di Spiezio Sardo, S. Petrosino, **M. Borriello**, S. Simonetti, P. Orlando, L. In sabato, C. Nappi, V. Di Marzo and T. Iuvone.. Activation of the

endocannabinoid system in endometrial carcinoma: possibile role in cancer cell growth control of cannabinoid CB2 receptor. (submitted).

Abstracts

1. Di Spiezio Sardo A, Giordano E, Galli V, Guerra G, Sammartino A, Bonifacio M, **Borriello M**, Greco E, Costagliola L, Nappi C. *Comparison of intranasal and transdermal estradiol on nasal mucosa in postmenopausal women.* 11th Meeting of the European Neuroendocrine Association (ENEA), 24-27 Aprile, 2004
2. **Borriello M**, Di Carlo C, Di Spiezio Sardo A, Masucci A, Di Iorio P, Bifulco G, Tommaselli GA, Nappi C. *L'ipoestrogenismo postmenopausale determina un aumento della concentrazione dei neuropeptidi vasocostrittori ed una diminuzione dei neuropeptidi vasodilatatori nelle terminazioni nervose della parete delle arterie.* IV Seminario Nazionale Dottorati di Ricerca in Ginecologia e Ostetricia, Siena 3 Febbraio 2006
3. Di Spiezio Sardo A., Guida M, Bifulco G, Frangini S, Festa M, Sosa Fernandez LM, **Borriello M**, Nappi C. *Outpatient hysteroscopy*

emptying of a submucosal uterine cystic lesion. 1st AAGL
International Congress in conjunction with Segi, Palermo 20-23
Giugno 2007.