

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA



DOTTORATO DI RICERCA IN GINECOLOGIA ONCOLOGICA

XXIII CICLO

**Coordinatore: Prof.<sup>ssa</sup> Nicoletta Colombo**

TESI DI DOTTORATO:

**IL MICROAMBIENTE PERITUMORALE  
NEL CARCINOMA ENDOMETRIALE  
UMANO**

Tutor:

*Dr. Roberto Tozzi*

Dottorando:

*Dr. Raffaella Giannice*

*Speciali ringraziamenti alla Prof.<sup>ssa</sup> Paola Allavena e al*

*Dr. Marco Erreni*

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	3
1.1. CHEMOCHINE.....	4
1.1.1. Asse CXCL12-CXCR4 e CXCR7.....	15
1.1.2. CXCL8.....	20
1.1.3. CXCL11.....	21
1.1.4. Chemochine e Macrofagi.....	22
1.2. CITOCHINE.....	24
1.2.1. Tumor necrosis factor .....	24
1.2.2. IL 6.....	26
1.3. MACROPHAGIC INHIBITORY FACTOR.....	29
1.4. TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta$ .....	32
1.5. OSTEOPONTINA.....	36
1.6. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR.....	38
1.7. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	42
<b>2. MATERIALI E METODO</b> .....	43
2.1. Raccolta campioni.....	43
2.2. Estrazione dell'RNA.....	42
2.3. Quantificazione RNA.....	43
2.4. Retrotrascrizione RNA .....	44
2.5. Real Time Quantitative Polymerase Chain reaction .....	47
2.6. Analisi statistica.....	52

3. <b>RISULTATI</b> .....	55
4. <b>DISCUSSIONE</b> .....	70
5. <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	79

# 1. INTRODUZIONE

Sempre maggiori evidenze scientifiche confermano che il microambiente tumorale gioca un ruolo importante nello sviluppo e nel comportamento dei tumori solidi.

In questo ambito, un numero limitato di autori si sono occupati del carcinoma dell'endometrio, se messo a confronto con altre neoplasie, pur essendo il tumore più frequente in ambito ginecologico [1-2].

In generale la prognosi del carcinoma endometriale dipende dall'istotipo, dalla presenza e dal numero delle metastasi linfonodali, dallo stadio, dal grado istologico e dall'invasione degli spazi linfovaskolari ma nel futuro prossimo l'analisi del microambiente peritumorale potrebbe fornirci ben altri importanti fattori prognostici con importanti risvolti in ambito terapeutico [3-6].

Nelle ultime decadi la correlazione tra tumore e risposta infiammatoria peritumorale è stata ampiamente accettata indicando il ruolo centrale del sistema immunitario nella progressione tumorale e nella prognosi come già preconizzato da Rudolf Virchow nel 1863, da William Coley alla fine del 1800 e da Paul Ehrlich con la sua teoria sulla sorveglianza immunitaria agli inizi del 900.

Da un lato vari studi epidemiologici hanno dimostrato come l'infiammazione cronica (per esempio infezioni come l'HPV e l'*helicobacter pylori*), malattie immunitarie e condizioni di infiammazione cronica idiopatica possano predisporre l'individuo a vari tipi di neoplasie.

Dall'altra parte è stato visto che il tumore stesso, indotto da un evento oncogenetico, sviluppa un microambiente peri-tumorale formato da cellule infiammatorie (granulociti, macrofagi etc.) e mediatori solubili come chemochine, citochine, prostaglandine e fattori di rimodellamento tissutale e angiogenesi che insieme interagiscono con le cellule tumorali, i vasi e l'infiltrato leucocitario [7-10].

Poter manipolare l' area di interazione tra tumore e tessuto ospite potrebbe essere di fondamentale importanza nel prevenire o convertire la trasformazione maligna e per limitare o incrementare l'accesso di farmaci al sito tumorale primitivo o metastatico, ritardare il metabolismo dei farmaci antitumorali e modificare lo sviluppo di resistenza ai farmaci ristabilendo un normale meccanismo di controllo immunitario [11].

Nelle neoplasie umane primarie, nel loro microambiente peritumorale, sono presenti una serie di chemochine (una superfamiglia di piccole citochine) che regolano l'estensione e il tipo

di infiltrato leucocitario così come influenzano il tipo di risposta immunitaria, la crescita tumorale, la neoangiogenesi, la sopravvivenza delle cellule tumorali e la loro capacità di migrazione. [12-18].

Le metastasi tumorali, invece, sono il risultato di un processo non-random nel quale fattori espressi a livello degli organi a distanza richiamano in maniera selettiva le cellule tumorali in quel sito preferenziale della metastatizzazione.

Sono questi fattori espressi a livello degli organi bersaglio e a livello locale nel tumore primario che indirizzano i primi passi necessari per la formazione delle metastasi: l'adesione delle cellule tumorali ai vasi sanguigni e linfatici, la loro extravasazione e quindi migrazione al sito metastatico.

Nelle cellule animali e vegetali l'informazione genetica è portata da molecole di DNA (nel nucleo) attraverso molecole di RNA (nel citoplasma). Il processo è catalizzato dall'RNA polimerasi ed è chiamato Trascrizione (fig 1).

Negli eucarioti tre differenti RNA polimerasi catalizzano la sintesi di tre diversi tipi di RNA. La trascrizione è il primo passo per la traduzione e la sintesi proteica. Ma da recenti scoperte sembra avere però anche un **ruolo nella regolazione dell'espressione**, grazie ad un fenomeno detto "interferenza".

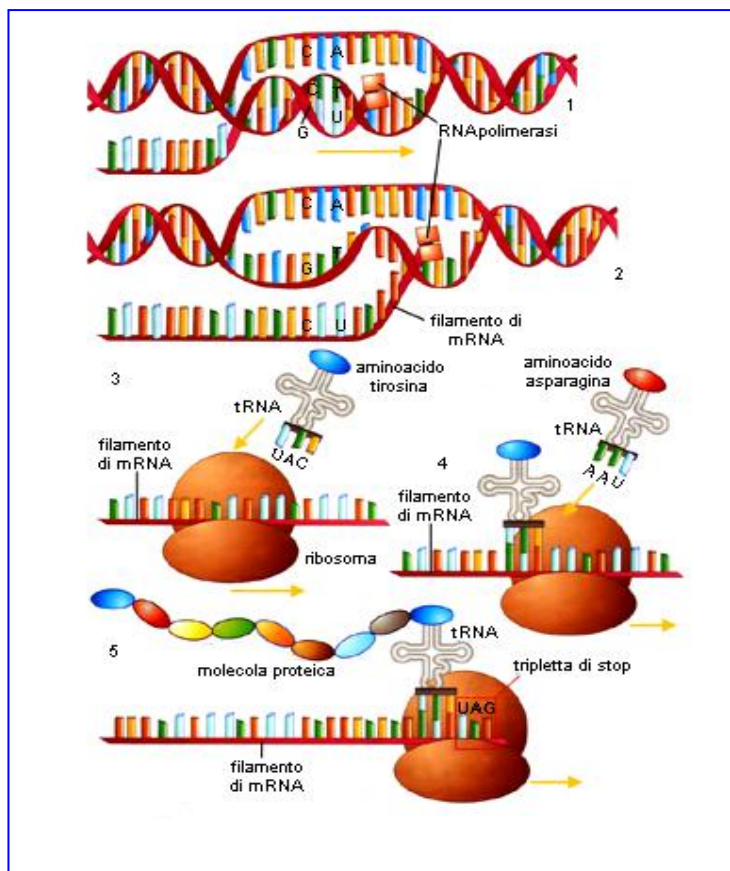
la sequenza di DNA (gene)  
trasferisce l'informazione

↓  
all'RNA, che dirige

↓  
la sintesi delle proteine

Abbiamo deciso di valutare il livello di espressione dell'mRNA dei vari geni presi in esame, in quanto l'espressione dell'mRNA è l'indice primario dell'attività genica.

Fig. 1 Trascrizione dell'mRNA



Infatti, partendo dalla sequenza di DNA di un particolare gene preso in esame (per esempio quello che produce il CXCL12) attraverso un processo di trascrizione, si ottiene la sintesi dell'mRNA di quel gene che a sua volta verrà usato come stampo dai ribosomi per iniziare la produzione della proteina specifica, in questo caso il CXCL12 (Fig 4).

### 1.1.0. LE CHEMOCHINE

**Le Chemochines** (dal greco *-kinos*, movimento) sono una famiglia di piccole citochine o proteine secrete dalle cellule. Il loro nome deriva dalla loro capacità di indurre la chemiotassi nelle cellule responsive adiacenti.

Queste proteine sono classificate come chemochine quando la loro dimensione è approssimativamente intorno agli 8-10 kilodaltons e se è presente un residuo di cisteina necessaria alla loro forma tridimensionale [19].

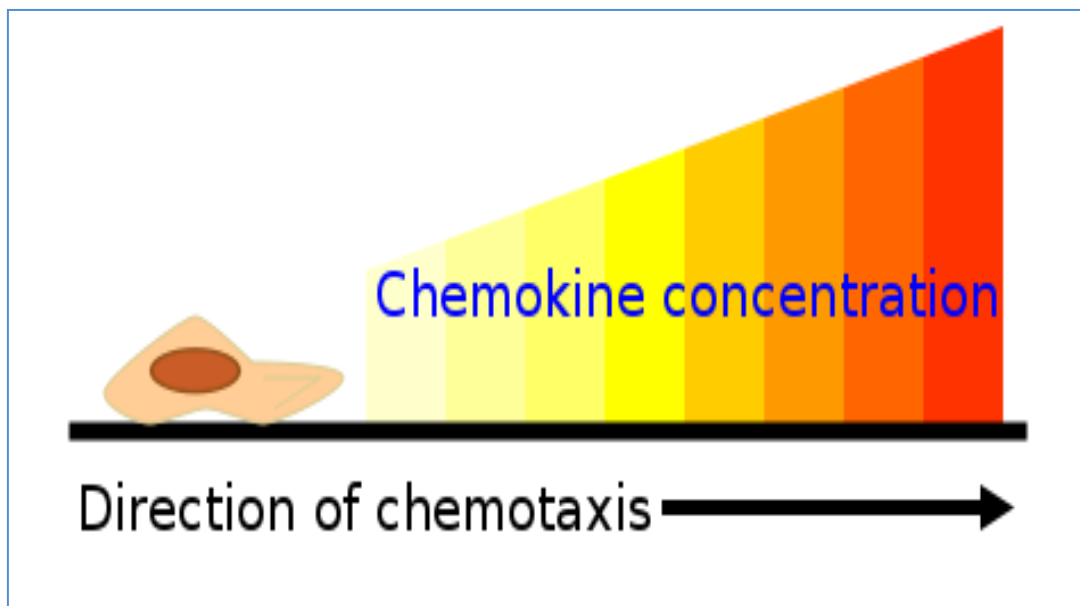
Alcune chemochine sono **pro-infiammatorie** nel senso che inducono la risposta immune al fine di attirare nel sito di infezione le cellule del sistema immunitario mentre altre sono **omeostatiche** nel senso che controllano il processo di migrazione delle cellule.



Queste proteine esercitano il loro effetto interagendo con i loro recettori transmembrana chiamati **recettori delle chemochine** [19].

Le cellule che sono attratte dalle chemochine seguono un segnale secondo un gradiente di concentrazione verso la sorgente delle chemochine stesse (fig.2).

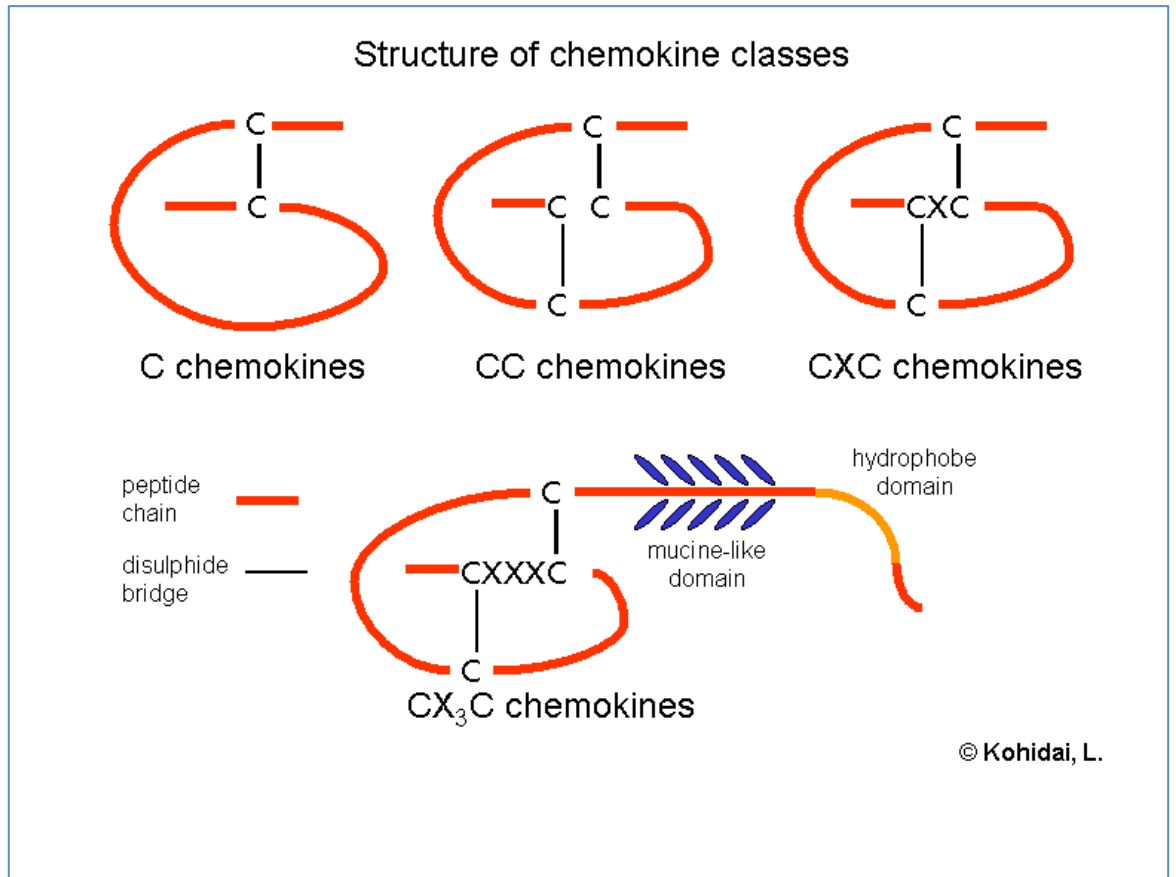
**Fig 1.:** Le chemochine vengono rilasciate dalle cellule danneggiate o infette secondo un gradiente di concentrazione. Le cellule target delle chemochine si muovono attraverso questo gradiente verso la più alta concentrazione delle chemochine stesse.



La famiglia delle chemochine si divide in quattro classi: C, CCL, CXC e CX<sub>3</sub>C (fig.2).

- Le **C chemochine** hanno un solo gruppo di cisteina nella loro struttura.
- Le **CC chemochine** hanno due gruppi di cisteina e comprendono 27 membri (CCL1-CC127).
- Le **CXC chemochine** hanno due gruppi di cisteina separati da un aminoacido, sono 17 e sono divise a loro volta in due categorie: quelle con una specifica sequenza di aminoacidi (detto motif) acido glutamico-leucina-arginina (o ELR) immediatamente prima della prima cisteina del CXC motif (denominate **ELR-positive**), e quelle senza l' ELR motif (denominate **ELR-negative**).
- Le **CX<sub>3</sub>C** chemochine, sono formate da 3 aminoacidi tra le due cisteine e l'unica fino ad ora studiata e stata chiamata fractalkine (o CX<sub>3</sub>CL1) [19].

**Fig.3:** Struttura delle differenti classi di chemochine.



**Tab. 1: Classificazione delle chemochine e dei loro recettori**

<b>CC chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<a href="#">CCL1</a>	Scya1	I-309, TCA-3	<a href="#">CCR8</a>	
<a href="#">CCL2</a>	Scya2	MCP-1	<a href="#">CCR2</a>	P13500
<a href="#">CCL3</a>	Scya3	MIP-1a	<a href="#">CCR1</a>	P10147
<a href="#">CCL4</a>	Scya4	MIP-1 $\beta$	<a href="#">CCR1</a> , <a href="#">CCR5</a>	P13236
<a href="#">CCL5</a>	Scya5	RANTES	<a href="#">CCR5</a>	P13501
<a href="#">CCL6</a>	Scya6	C10, MRP-2	<a href="#">CCR1</a>	P27784
<a href="#">CCL7</a>	Scya7	MARC, MCP-3	<a href="#">CCR2</a>	P80098
<a href="#">CCL8</a>	Scya8	MCP-2	<a href="#">CCR1</a> , <a href="#">CCR2B</a> , <a href="#">CCR5</a>	P80075
<a href="#">CCL9/CCL10</a>	Scya9	MRP-2, CCF18, MIP-1?	<a href="#">CCR1</a>	P51670
<a href="#">CCL11</a>	Scya11	Eotaxin	<a href="#">CCR2</a> , <a href="#">CCR3</a> , <a href="#">CCR5</a>	P51671
<a href="#">CCL12</a>	Scya12	MCP-5		Q62401
<a href="#">CCL13</a>	Scya13	MCP-4, NCC-1, Ck $\beta$ 10	<a href="#">CCR2</a> , <a href="#">CCR3</a> , <a href="#">CCR5</a>	Q99616
<a href="#">CCL14</a>	Scya14	HCC-1, MCIF, Ck $\beta$ 1, NCC-2, CCL	<a href="#">CCR1</a>	Q16627
<a href="#">CCL15</a>	Scya15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	<a href="#">CCR1</a> , <a href="#">CCR3</a>	Q16663
<a href="#">CCL16</a>	Scya16	LEC, NCC-4, LMC, Ck $\beta$ 12	<a href="#">CCR1</a> , <a href="#">CCR2</a> , <a href="#">CCR5</a> , <a href="#">CCR8</a>	O15467
<a href="#">CCL17</a>	Scya17	TARC, dendrokinine, ABCD-2	<a href="#">CCR4</a>	Q92583
<a href="#">CCL18</a>	Scya18	PARC, DC-CK1, AMAC- 1, Ck $\beta$ 7, MIP-4		P55774
<a href="#">CCL19</a>	Scya19	ELC, Exodus-3, Ck $\beta$ 11	<a href="#">CCR7</a>	Q99731
<a href="#">CCL20</a>	Scya20	LARC, Exodus-1, Ck $\beta$ 4	<a href="#">CCR6</a>	P78556
<a href="#">CCL21</a>	Scya21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ck $\beta$ 9, TCA-4	<a href="#">CCR7</a>	O00585
<a href="#">CCL22</a>	Scya22	MDC, DC/ $\beta$ -CK	<a href="#">CCR4</a>	O00626
<a href="#">CCL23</a>	Scya23	MPIF-1, Ck $\beta$ 8, MIP-3, MPIF-1	<a href="#">CCR1</a>	P55773
<a href="#">CCL24</a>	Scya24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck $\beta$ 6	<a href="#">CCR3</a>	O00175
<a href="#">CCL25</a>	Scya25	TECK, Ck $\beta$ 15	<a href="#">CCR9</a>	O15444
<a href="#">CCL26</a>	Scya26	Eotaxin-3, MIP-4a, IMAC, TSC-1	<a href="#">CCR3</a>	Q9Y258
<a href="#">CCL27</a>	Scya27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine	<a href="#">CCR10</a>	Q9Y4X3
<a href="#">CCL28</a>	Scya28	MEC	<a href="#">CCR3</a> , <a href="#">CCR10</a>	Q9NRJ3

<b>CXC chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<a href="#">CXCL1</a>	Scyb1	Gro-a, GRO1, NAP-3, KC	<a href="#">CXCR2</a>	P09341
<a href="#">CXCL2</a>	Scyb2	Gro-β, GRO2, MIP-2a	<a href="#">CXCR2</a>	P19875
<a href="#">CXCL3</a>	Scyb3	Gro-γ, GRO3, MIP-2β	<a href="#">CXCR2</a>	P19876
<a href="#">CXCL4</a>	Scyb4	PF-4	<a href="#">CXCR3B</a>	P02776
<a href="#">CXCL5</a>	Scyb5	ENA-78	<a href="#">CXCR2</a>	P42830
<a href="#">CXCL6</a>	Scyb6	GCP-2	<a href="#">CXCR1</a> , <a href="#">CXCR2</a>	P80162
<a href="#">CXCL7</a>	Scyb7	NAP-2, CTAPIII, β-Ta, PEP		P02775
<a href="#">CXCL8</a>	Scyb8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	<a href="#">CXCR1</a> , <a href="#">CXCR2</a>	P10145
<a href="#">CXCL9</a>	Scyb9	MIG, CRG-10	<a href="#">CXCR3</a>	Q07325
<a href="#">CXCL10</a>	Scyb10	IP-10, CRG-2	<a href="#">CXCR3</a>	P02778
<a href="#">CXCL11</a>	Scyb11	I-TAC, β-R1, IP-9	<a href="#">CXCR3</a> , <a href="#">CXCR7</a>	O14625
<a href="#">CXCL12</a>	Scyb12	SDF-1, PBSF	<a href="#">CXCR4</a> , <a href="#">CXCR7</a>	P48061
<a href="#">CXCL13</a>	Scyb13	BCA-1, BLC	<a href="#">CXCR5</a>	O43927
<a href="#">CXCL14</a>	Scyb14	BRAK, bolekin		O95715
<a href="#">CXCL15</a>	Scyb15	Lungkine, WECH		Q9WVL7
<a href="#">CXCL16</a>	Scyb16	SRPSOX	<a href="#">CXCR6</a>	Q9H2A7
<a href="#">CXCL17</a>	VCC-1	DMC, VCC-1		Q6UXB2
<b>C chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<a href="#">XCL1</a>	Scyc1	Lymphotactin α, SCM-1α, ATAC	<a href="#">XCR1</a>	P47992
<a href="#">XCL2</a>	Scyc2	Lymphotactin β, SCM-1β	<a href="#">XCR1</a>	Q9UBD3
<b>CX3C chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<a href="#">CX3CL1</a>	Scyd1	Fractalkine, Neurotactin, ABCD-3	<a href="#">CX3CR1</a>	P78423

A causa della loro capacita' di indurre sia la migrazione che la proliferazione, le chemochine e i loro recettori sono i candidati ideali a regolare lo sviluppo angiogenetico. Infatti molte chemochine e i loro recettori sono stati trovati correlati direttamente all'angiogenesi sia in vitro che in vivo [20-25].

E' necessario però, prima di parlare dell'angiogenesi, di sottolineare la differenza tra angiogenesi e vasculogenesi.

Precocemente durante l'embriogenesi, isole di sangue composte da progenitori delle cellule del sistema emopoietico ed endoteliale (angioblasti) si differenziano dal mesoderma per formare i vasi (VASCULOGENESI). Mentre la vasculogenesi è un fenomeno limitato all'embriogenesi, l'ANGIOGENESI puo' verificarsi sia durante l'embriogenesi che nella vita postnatale.

L'angiogenesi si riferisce quindi più propriamente al processo di formazione di nuovi vasi da vasi preesistenti e avviene sia durante processi normali di rigenerazione tissutale che durante la progressione di malattia.

La formazione di nuovi vasi dai parentali richiede alcuni passaggi: inizialmente la membrana basale dei vasi di origine deve essere degradata, successivamente si ha la rottura delle giunzioni tra le cellule endoteliali e quindi la migrazione delle cellule tumorali in direzione dello stimolo angiogenetico fino alla formazione di una rete tubulare di nuovi vasi (neoangiogenesi) [26-27].

Tuttavia un angiogenesi aberrante è presente nei tumori in progressione ed è considerata un processo necessario per la progressione da lesione benigna ad invasiva e alla metastatizzazione [28-30].

Specifiche chemochine sono state evidenziate espresse nelle cellule endoteliali sia a livello di mRNA che di espressione proteica insieme ad altri fattori solubili angiogenetici ed infiammatori durante il processo di guarigione delle ferite e durante la genesi tumorale [31-32].

Delle 4 famiglie di chemochine le CXC chemochine sono state dimostrate avere un ruolo importante nell'angiogenesi.

Questa famiglia (CXC chemochine) comprende membri che agiscono sia come inibitori che come promotori dell'angiogenesi. Sembra che le CXC chemochine con ELR motif (ELR+) abbiano un'azione di stimolo alla migrazione cellulare, proliferazione e neoangiogenesi in vivo mentre le chemochine in cui è assente il motif (ELR-) agiscono inibendo migrazione, proliferazione e neoangiogenesi [33-35].

Tuttavia una chemochina con ELR- , CXCL12 e il suo recettore CXCR4 sono stati dimostrati stimolare l'angiogenesi e giocare un ruolo importante nella carcinogenesi e nel processo metastatico [36-37]

Il meccanismo con cui l'asse CXCL12/CXCR4 stimola l'angiogenesi potrebbe forse essere differente dal meccanismo col quale le chemochine ELR+ stimolano la neovascolarizzazione tumorale.

### **1.1.1. ASSE CXCL12-CXCR4 e CXCR7**

CXCL12 (SDF-1 $\beta$ ) è stato ampiamente trovato implicato nella promozione dell'angiogenesi [38]. Hedeimann ha dimostrato che il recettore del CXCL12, il CXCR4, era iper-espresso nelle cellule endoteliali microvascolari intestinali e che CXCL12 stimolava la chemiotassi e la proliferazione di queste cellule endoteliali oltre che promuovere la formazione di vasi endoteliali [39].

Salcedo ha dimostrato che CXCL12 induceva un aumento dell'espressione del VEGF da parte delle cellule endoteliali e con feedback positivo, stimolava l'espressione del CXCR4 sulle cellule endoteliali [40].

Di recente è stato dimostrato un collegamento tra metastasi e angiogenesi attraverso l'asse CXCL12/ CXCR4. La Fosfogliera Chinasi (PGK) ha funzioni angiostatiche. Nei siti metastatici un elevato livello di CXCL12/CXCR4 inibisce l'espressione della PGK con un effetto di stimolo angiogenetico [41].

Inoltre secondo Guleng, l'inibizione dell'asse CXCL12/ CXCR4 sembra ridurre la crescita dei tumori gastrointestinali mediante la soppressione dello stimolo angiogenetico [42]. Tuttavia la sorgente del CXCL12 nei tumori rimane incerta. E' stata formulata l'ipotesi che il CXCL12 associato ai tumori sia secreto da cellule



stromali intratumorali specializzate o da fibroblasti associati alle cellule tumorali (CAF: carcinoma associated stromal fibroblast) [43].

Muller invece, riporta che l'asse CXCL12/CXCR4 è implicato nell'induzione delle metastasi ma non dell'angiogenesi, sia nel tumore della mammella che nel tumore a piccole cellule del polmone [44].

L'asse CXCL12/CXCR4 è stato anche implicato nel reclutamento delle cellule circolanti derivate dal midollo osseo (RBCCs) nei siti di neovascolarizzazione attiva [45].

Grunewald ha inoltre dimostrato che inibendo questo meccanismo mediante l'utilizzo di un inibitore del CXCR4 riusciva a bloccare l'angiogenesi in vivo [46].

Il CXCL12 e il suo recettore CXCR4 sono largamente espressi in vari tumori a confronto dei tessuti normali corrispondenti [47].

Nel tessuto peritumorale l'interazione tra CXCL12–CXCR4 e il CXCR7 gioca un ruolo critico nella migrazione delle cellule tumorali nei siti metastatici in vari tumori (mammella, ovaio, prostata, pancreas, esofago, NSLCC, vescica, colonretto, melanoma, osteosarcoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, leucemia linfoblastica acuta e cronica). L'iper-espressione di CXCR4/CXCL12 è correlata con metastasi polmonari, al fegato, ai linfonodi e ossee

mentre l'iper-espressione dell'asse CCR7/CCL21 è principalmente correlata con metastasi linfonodali [48-54].

Infatti, mentre il CXCL12 è espresso in tessuti normali come fegato, polmone, linfonodi, surrene e midollo osseo spiegando perché alcuni tumori utilizzano l'asse CXCL12-CXCR4 per metastatizzare, il CXCL12 può legarsi anche al recettore CXCR7 che è espresso in cellule endoteliali, Linfociti T, cellule dendritiche, linfociti B, condrociti, spiegando perché questo asse è correlato alle metastasi linfatiche [54-55].

In particolare, il CXCR4 media la metastatizzazione organo-specifica aumentando la motilità delle cellule tumorali, promuovendo le metastasi e inducendo la produzione di fattori nell'ospite che stimolano la crescita, la sopravvivenza tumorale e la produzione di metalloproteasi della matrice extracellulare [12, 56-60].

Infatti, fisiologicamente l'asse CXCR4-CXCL12 è stato trovato coinvolto nella migrazione di cellule embrionali coinvolte nello sviluppo del sistema nervoso, del midollo osseo e del cuore [61-62].

Il segnale d'inizio della migrazione utilizzato durante l'embriogenesi potrebbe ristabilirsi durante la progressione tumorale determinando la metastatizzazione delle cellule neoplastiche.

Mentre l'interazione tra CXCL12 e CXCR4 esita in una chemiotassi e capacità migratoria delle cellule secondo un gradiente del CXCL12, nel caso del CXCR7 sembra mediare anche proliferazione e crescita tumorale [63-65].

Sembrerebbe che in condizioni di normale ossigenazione tessutale del tessuto tumorale la von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL) inibisca l'espressione del CXCR4 mediante la degradazione del fattore inducente l'ipossia (HIF-1- $\alpha$ ) mentre una condizione di ipossia possa promuovere la trascrizione dell' HIF-1- $\alpha$  e quindi indurre un'iper-espressione del CXCR4 [66-67].

Nel tumore a piccole cellule del polmone è stata dimostrata un'iper-espressione del CXCR4 indotta dal CXCL12 tramite l'attivazione di alcune integrine ( $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1 integrins) il cui risultato finale è un aumento dell'adesività delle cellule tumorali alla matrice extracellulare, alla fibronectina e al collagene rendendo il tessuto tumorale chemio-resistente [68]. Questo effetto di chemioresistenza potrebbe essere antagonizzato dagli inibitori del CXCR4 [68].

Nel carcinoma endometriale la chemochina più studiata è il CXCL12 col suo recettore CXCR4. Quattro studi hanno dimostrato l'associazione tra l'iper-espressione di CXCL12-CXCR4 e la prognosi con risultati contraddittori.

Usando l'immunoistochimica Tsukamoto ha dimostrato che l'espressione di CXCR4 era significativamente maggiore nei casi in cui l'infiltrazione del miometrio era maggiore del 50% e che gli anticorpi anti CXCR4 e gli antagonisti del CXCR4 inibivano la migrazione delle cellule del carcinoma endometriale in colture cellulari [6].

Questo studio sembrerebbe dimostrare che che l'asse CXCL12-CXCR4 gioca un ruolo importante nel fenomeno dell'infiltrazione tumorale tra le cellule dello strato muscolare liscio e le cellule della mucosa endometriale [6].

Al contrario Mizokami e Kodama hanno dimostrato che l'iper-espressione di CXCL12 e CXCR4 è inversamente correlata al grado istologico [69-70]. Le percentuali di sopravvivenza erano significativamente migliori nelle pazienti con i più elevati livelli di espressione del CXCR4 [69-70].

Gelmini invece non ha riportato associazione tra prognosi ed espressione del CXCR4 [71]. Nei topi con carcinoma endometriale trattati con anticorpi anti CXCR4 umano Gelmini ha evidenziato una significativa diminuzione delle metastasi spontanee peritoneali e che le metastasi epatiche e polmonari erano del tutto inibite [71].

### 1.1.2. CXCL8

CXCL8 è una chemochina correlate a invasività e neoangiogenesi. L'iper-espressione di CXCL8 riflette il livello di aumentata invasività delle cellule tumorali nel carcinoma mammario nella matrigel [72]. Il liquido dove queste cellule tumorali sono cresciute iniettato sotto la cute in topi di laboratorio promuove l'angiogenesi [72].

CXCL8 è espresso nelle cellule di melanoma in vitro e induce la mitosi cellulare come è stato dimostrato dall'inibizione della mitosi delle stesse cellule utilizzando anticorpi monoclonali contro il CXCL8 [73].

Sembra che le cellule di melanoma metastatizzino nei differenti organi esprimendo livelli differenti di iper-espressione del CXCL8 [73].

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  possono indurre un incremento dose-dipendente dell'espressione del CXCL8 nelle cellule polmonari tumorali [74]. Bloccando il TNF- $\alpha$  e l'IL-1 $\alpha$  con anticorpi neutralizzanti Yao ha ottenuto una riduzione dell'espressione del CXCL8 nei macrofagi associati alle cellule tumorali polmonari [74].

Nel tumore prostatico CXCL8 è stato implicato nella crescita in modo androgeno dipendente [75-76]. Inoltre è stato dimostrato che

il il TGF- $\beta$ 1 stimola l' espressione di CXCL8 in linee cellulari di carcinoma prostatico [77].

Di recente è stato evidenziato anche il VEGF come fattore di stimolo sul CXCL8 nel promuovere la neoangiogenesi in vitro [78].

Un'altra via di promozione della neoangiogenesi nel carcinoma umano ovarico mediante la produzione di TNF e CXCL8 da parte delle cellule dendritiche associate al tumore è stata dimostrata da Curiel [79].

Yoneda nel tumore ovarico ha evidenziato che l'iper-espressione di CXCL8/IL-8 era associata in modo direttamente proporzionale alla neovascolarizzazione ed inversamente proporzionale alla sopravvivenza [80]. In vitro, IL-6 e l'asse CXCL8/IL-8 accelerano la proliferazione di molte linee cellulari di carcinoma polmonare [81].

### **1.1.3. CXCL11**

CXCL11 è una CXC chemochina ELR- motif con attività angiostatica in risposta al VEGF [15,25].

Nel mieloma multiplo CXCL11 è principalmente prodotta dai macrofagi e agisce sul CXCR3 presente su molte linee cellulari

inducendo chemiotassi. Questa chemochina aumentando i livelli di fosfo-tirosina stimola la secrezione di MMP-2 e MMP-9 entrambe coinvolte nella progressione tumorale, invasione e metastasi nello stadio avanzato del mieloma multiplo [82].

Le cellule endoteliali del midollo osseo in casi di mieloma multiplo producono livelli elevati di CXCL8, CXCL11 e CXCL12 rispetto alle cellule endoteliali della vena ombelicale normale (HUVEC) e stimolano la proliferazione di queste cellule [83].

Nel tumore ovarico, Levina ha dimostrato che l'inibizione di CXCL11 tramite anticorpi neutralizzanti aumenta significativamente la risposta delle cellule tumorali ovariche al cisplatino [84].

#### **1.1.4. CHEMOCHINE E MACROFAGI**

Tra le CXC chemokines, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 sono stimulate dall' interferone  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e sono tipicamente chemiotattiche nei confronti dei Linfociti Natural Killer NK [85].

In generale, le CXC chemokines presentano un'azione chemiotattica nei confronti dei neutrofili e dei linfociti mentre le CC chemochine nei confronti dei linfociti e dei monociti [86]. L'infiltrato leucocitario peritumorale varia quindi in risposta alle chemochine secrete dal tumore o dallo stroma. In una fase iniziale questo richiamo

puo' favorire un attivita' antitumorale, come l'eliminazione delle cellule tumorali ad opera dei macrofagi.

Tuttavia in una fase piu' avanzata, le chemochine secrete dal tumore stimolano i leucociti a favorire la crescita tumorale e fornire fattori di sopravvivenza alle cellule neoplastiche, come i mediatori angiogenetici per stimolare la vascolarizzazione e la linfangiogenesi del tumore [10, 86-87].

I leucociti persistentemente esposti alle chemochine nel contesto del tessuto tumorale assumerebbero un fenotipo di tipo II che sopprime la risposta immunitaria in risposta alla secrezione di IL10 e TGF $\beta$  [87].

Questo meccanismo starebbe alla base del fatto che le cellule tumorali riescono con questo meccanismo a sfuggire alla distruzione immunitaria.

Come spiegato da Balkwill et al. la progressione tumorale sarebbe frutto di una selezione Darwiniana grazie a fattori e mediatori che favoriscono la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali rispetto a quelle sane [88].

Le cellule tumorali riacquisterebbero la capacita' che avevano durante l'embriogenesi, capacita' di migrare in altri tessuti e questo darebbe loro un vero e proprio vantaggio evolutivo sulle cellule normali.



## **1.2.0. CITOCHINE**

### **1.2.1.TNF**

Il Fattore di Necrosi Tumorale (TNF) è una citochina pro-infiammatoria prodotta dai macrofagi attivati e da fibroblasti, cellule nervose, cellule epiteliali in risposta ad una lesione o ad una infiammazione cronica e pro-apoptotica nei confronti di svariati tipi di tumori [89-91].

La scoperta della protezione acquisita dai topi con deficit del TNF nei confronti degli stimoli cancerogeni della cute ha offerto evidenze genetiche della promozione tumorale del TNF [86].

La promozione tumorale mediata dal TNF può utilizzare differenti vie: un effetto diretto sulle cellule tumorali con bassa concentrazione di questa citochina; una interazione col sistema delle chemochine con induzione del CXCR4 e la stimolazione dell'epitelio mesenchimale di transizione [92].

Questi dati hanno costituito il necessario background per lo sviluppo di protocolli clinici che utilizzano gli antagonisti del TNF nella terapia antitumorale [93-96].

Tabibzadeh ha dimostrato che fisiologicamente il TNF è coinvolto nelle modificazioni cicliche endometriali [95]. L'espressione dell' RNA messaggero del TNF è ciclo-dipendente

specifica aumentando nella fase secretiva tardiva a durante la mestruazione [95]. Un aumento delle concentrazioni sieriche di TNF è stato rilevato in pazienti con carcinoma endometriale e significativamente correlato con un alto rischio di carcinoma endometriale [95-100].

Nel carcinoma ovarico l'invasione da parte delle cellule ovariche è completamente inibita dal Marimastat, un inibitore dell'enzima di conversione del TNF, indicando che il TNF gioca un ruolo fondamentale nella carcinogenesi ovarica [48].

Alcune chemochine e fattori di crescita sono correlati con il TNF. Come già' accennato, il CXCL8 è una chemochina correlate all'invasività e alla neoangiogenesi. Nelle cellule di carcinoma polmonare l'espressione del CXCL8 è aumentata in maniera dose dipendente dal TNF. L'inibizione del TNF e dell'IL1 con anticorpi neutralizzanti ha ridotto l'espressione del CXCL8 nei macrofagi delle cellule tumorali polmonari [74].

Da notare, in colture cellulari di carcinoma ovarico, silenziando il TNF, Kulbe ha dimostrato una riduzione significativa dei livelli di VEGF [99].

In particolare, nel carcinoma ovarico Kulbe ha descritto 3 mediatori-chiave dell'infiammazione correlata ai tumori: il TNF,

CXCL12 e l' IL6 che costituiscono una rete denominate "TNF network".

Gli autori hanno dimostrato che questa rete ha un'azione paracrina sull'angiogenesi e nell'infiltrazione delle cellule mieloidi nelle biopsie ottenute da carcinomi umani ovarici [99].

Neutralizzando con anticorpi o SiRNA (RNA silencing) TNF, CXCL12 e IL6 gli autori sono riusciti ad ottenere una riduzione dell'angiogenesi, dell'infiltrazione mioeloidica e della crescita tumorale in vitro [99].

### **1.2.2. IL6**

**IL6** (interferon  $\beta$  2, HGF) è un'interleuchina che ha sia un'azione pro-infiammatoria che anti-infiammatoria. E' secreta dai linfociti T e dai macrofagi per stimolare la risposta immunitaria ad un trauma portando all'infiammazione [100].

Pazienti con carcinoma avanzato/metastatico presentano alti livelli ematici di IL-6. Da qui l'interesse nello sviluppare agenti anti IL-6 come terapia contro i tumori [100].

Il primo di questi è il siltuximab e gli anticorpi anti IL-6. Il trattamento con siltuximab inibisce la crescita tumorale, l'infiltrazione dei macrofagi peritumorali e l'angiogenesi in cellule di tumori ovarici trapiantati e produttori IL-6.

Coward ha riportato in un trial clinico che una paziente su 18 ebbe una risposta parziale mentre altre 7 ebbero un periodo di stabilizzazione della malattia [101].

Sempre Coward ha dimostrato in 221 campioni di carcinoma ovarico che l'intensità della positività immuno-istochimica dell'IL-6 nelle cellule tumorali era significativamente associato a prognosi severa [101].

L'IL-6 ha un'azione di promozione della crescita tumorale e infiammatoria anti-apoptotica ed è anche un effettore di segnale di attivazione del NF-KB nel promuovere la neoplasia [102-103].

Un ruolo chiaramente pro-tumorale dell'IL-6 è stato già dimostrato anche nel mieloma multiplo [104]. Lattanzio, confermando questi dati, ha dimostrato che i topi IL-6 deficienti presentavano una resistenza allo sviluppo del plasmacitoma murino [105].

Più di recente un altro studio ha confermato questa via alternativa tra IL-6 e neoplasie, che trova un tramite nell'NF-KB [106]. Una delle associazioni più chiare è stata dimostrata nel

carcinoma del colon associato alla colite (CAC) dove, in modelli di cavie, il TGF- $\beta$  inibiva la trasformazione tumorale mediante l'inibizione dell' IL-6 [107].

Secondo un altro autore, pazienti con carcinoma del colon presentavano alti livelli di IL-6 e bassi livelli di recettori per IL-6 [107].

Un esempio piu' chiaro si ha nel carcinoma epatocellulare (HCC), la piu comune neoplasia del fegato che frequentemente è indotta da un' infiammazione cronica dello stesso fegato (infezione da HBV o da HCV) o da alcolismo cronico: nei pazienti con queste patologie croniche i livelli di IL-6 sono usualmente elevati [108-109].

Le cellule di Kupffer epatiche, sotto stimolo cronico, producono IL-6 che promuove lesioni epatiche, infiammazione, proliferazione cellulare compensatoria, e infine carcinogenesi.

Nei topi femmina invece è stato notato che, tramite fattori di trascrizione dei geni (come l' NF-KB) gli estrogeni inibiscono la produzione di IL-6 da parte delle cellule di Kupffer determinando una protezione dal carcinoma epatico [110].

Anche nel carcinoma della mammella l' IL-6 gioca un ruolo chiave perche' la presenza di un polimorfismo nella regione promoter dell' IL-6, determinando conseguenti alti livelli di IL-6, diventa un

fattore genetico di predisposizione che peggiora la prognosi nelle pazienti con neoplasie della mammella [111].

### **1.3.0. FATTORE INIBENTE I MACROFAGI**

Le cellule che si trovano nel microambiente tumorale giocano un ruolo indispensabile nella progressione carcinogenica come già illustrato nel capitolo precedente (1.1.4.). I macrofagi associati al tumore (TAM) rappresentano una componente prominente della popolazione dei leucociti mononucleati che compongono i tumori solidi, il che dimostra una loro relazione ambivalente con il tumore [112-113].

Essi originano nel circolo ematico e sono attratti al tumore da sostanze come le chemochine prodotte dalle cellule tumorali stesse preferenzialmente nell'interfaccia ospite-tumore in regioni spesso a bassa tensione di ossigeno [112-113]. Il microambiente peritumorale, incluso le citochine e l'ipossia, regola la localizzazione e la funzione dei TAM.

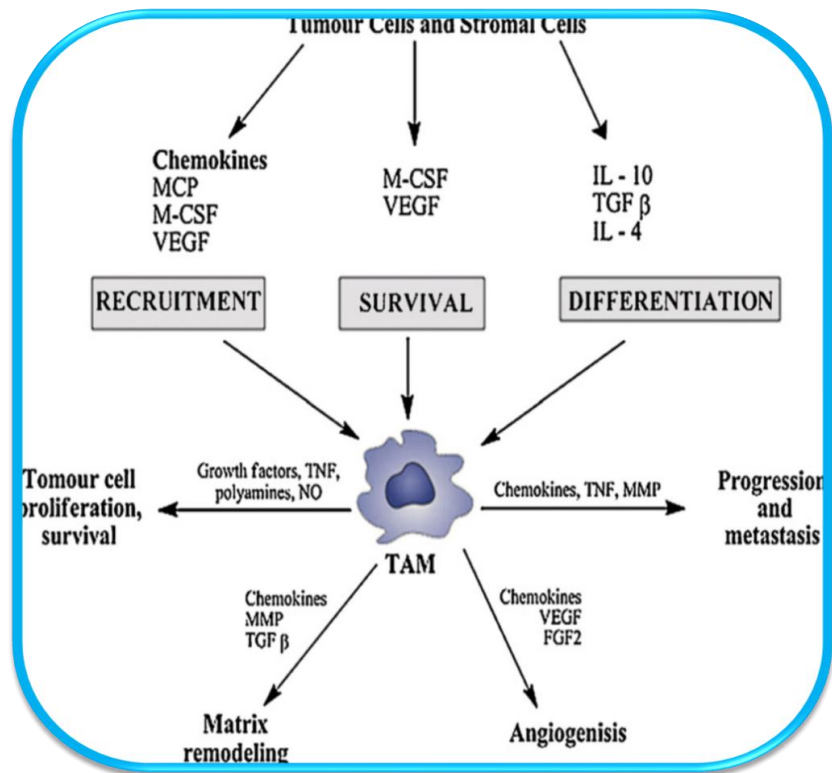
Tra le sostanze chemoattraenti nei confronti dei macrofagi prodotte dalle cellule tumorali ci sono il VEGF e il MIF [114].

Il Fattore Inibente i Macrofagi (MIF) è una citochina pro-infiammatoria implicata in molte malattie infiammatorie croniche e

autoimmuni che influenzano le cellule del sistema ematopoietico a differenziarsi in macrofagi [115-118].

Alcuni autori hanno dimostrato che il MIF è in grado di aumentare la diffusione delle cellule neoplastiche tramite la modulazione della risposta immune e la promozione di angiogenesi (Figura 4) [118-122].

**Fig 4:** Ruolo dei macrofagi nella progressione tumorale [Da K.S.Siveen, G Kuttan. *Immunology letters* 123,2009:97-102]



Denz ha riportato che l'inibizione del MIF porta all'arresto del ciclo cellulare e all'arresto dell'apoptosi in cellule di carcinoma pancreatico [123].

Il MIF è iper-espresso nel carcinoma della mammella a confronto col tessuto mammario normale con una correlazione direttamente proporzionale, e statisticamente significativa, all'espressione dei recettori del progesterone e degli estrogeni (markers di prognosi favorevole), e inversamente proporzionale al volume tumore [124].

In linea con questi risultati, la sopravvivenza specifica alla malattia e la sopravvivenza libera da malattia erano significativamente migliorate nelle pazienti con carcinoma della mammella con iper-espressione del MIF in confronto a quelle con espressione normale (5-year OS = 67% versus 50%,  $p = 0.0019$ ; 5-year RFS = 52% versus 36%,  $p = 0.0327$ ) [124].

Il MIF è inoltre implicato nella crescita e progressione tumorale attraverso lo stimolo della neoangiogenesi.

In particolare in linee cellulari di carcinoma endometriale Bondza, somministrando il MIF, ha dimostrato che l'iper-espressione dell'mRNA del VEGF era stimolata in modo dose dipendente e tempo dipendente dopo 24 ore dal trattamento dal MIF.



L'analisi ELISA del rilascio del VEGF nelle colture cellulari dimostrava che il MIF (25 ng/ml) induceva significativamente la secrezione a 12 e 24 ore [125].

### **1.3.0. TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta$**

Il Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) è una citochina multifunzionale che regola molte funzioni biologiche dalla crescita-differenziazione cellulare all'apoptosi [126].

Sembrerebbe che il TGF- $\beta$  durante il primo stadio della carcinogenesi possa esercitare un' inibizione della progressione tumorale mentre negli stadi avanzati stimoli la progressione tumorale, l' invasione e la metastatizzazione.

Inoltre, le cellule tumorali spesso acquisiscono una resistenza intrinseca all'effetto inibitorio sulla crescita e sugli effetti pro-apoptotici del TGF- $\beta$ , cosicché il TGF- $\beta$  riesce a conferire proprietà invasive alle cellule tumorali solo una volta trasformate [126-127].

Livelli elevati di TGF- $\beta$  potrebbero anche riuscire a determinare un vantaggio selettivo per la crescita tumorale perché il TGF- $\beta$  è potentemente immunosoppressivo e angiogenetico nell'ospite [128-131].

Un aumentata espressione dell'isoforma del TGF- $\beta$  in una varietà di neoplasie umane (*es. mammella, colon, pancreas, stomaco, cervello, prostata*) è stata correlata con una diminuita sopravvivenza a perciò alti livelli di TGF- $\beta$  potrebbero essere considerati un biomarker tumorale di prognosi severa in questi tumori [128,132].

TGF- $\beta$  prodotto dai tumori può convertire CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup> cellule T in CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> cellule T che permettono l'evasione immune delle cellule tumorali [133].

Nel microambiente tumorale normale i fibroblasti quiescenti vengono attivati e quindi chiamati fibroblasti tumore-associati (tumor-associated fibroblasts or CAFs/TAFs), fibroblasti stromali reattivi o miofibroblasti [134].

I TAFs formano il volume dello stroma tumorale, come identificato dalla espressione di actina sulla superficie delle cellule muscolari lisce ( $\alpha$ -SMA), che è altrimenti assente nei fibroblasti del tessuto normale. Il meccanismo di conversione dei fibroblasti normali in TAFs però, non è ancora completamente conosciuto [134].

E' stato dimostrato che i fibroblasti quiescenti ottenuti da colture di carcinoma della mammella possono essere indotti ad acquisire un fenotipo TAFs dal TGF- $\beta$ 1 in vitro [135].

Il TGF- $\beta$  può facilitare la crescita tumorale stimolando l'angiogenesi e sopprimendo la sorveglianza immunitaria ed è stato

identificato come potenziale modulatore di molte funzioni endometriali regolando geni che controllano la progressione del ciclo cellulare [128, 133, 136-138].

Alcuni autori hanno evidenziato che il TGF $\beta$  e il Tumour Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), giocano un ruolo importante nella regolazione della crescita e differenziazione endometriale e nell'interazione del tessuto endometriale con estrogeni e progesterone [138-141].

Infatti è ben noto che l'azione di stimolo dell'endometrio da parte degli estrogeni, non bilanciato dell'effetto differenziante del progesterone, è uno dei principali fattori eziologici dell'iperplasia e del carcinoma endometriale di tipo I [142].

In tutti i casi di carcinoma endometriale confrontati con campioni di endometrio proliferativo normale, Perlino ha evidenziato una riduzione significativa dell'espressione dei livelli di mRNA del TGF $\beta$ 1 [143].

Non ha trovato dirette correlazioni tra la riduzione dell'espressione del TGF- $\beta$ 1 con il grado di differenziazione tumorale ma è interessante notare che la maggior parte della riduzione dei livelli di espressione dell' mRNA del TGF- $\beta$ 1 è stato identificato nei carcinomi sierosi scarsamente differenziati [143].

Trilok ha dimostrato che la progressione maligna del carcinoma endometriale era associata ad una precoce riduzione della risposta al TGF- $\beta$  *in vivo* [144].

In uno studio di Rodriguez viene evidenziato come il progesterone induce marcata apoptosi sia nelle ghiandole endometriali che nella superficie stromale. Le aree di marcata apoptosi sia nelle ghiandole che nello stroma endometriale presentavano una marcata espressione di TGF- $\beta$  suggerendo che questi due eventi biologici potrebbero essere correlati [145].

Il TGF- $\beta$  è correlato anche al fattore di inibizione Mulleriano, un peptide che provoca una completa regressione apoptotica del sistema mulleriano negli embrioni di sesso maschile in vivo, e che è stato dimostrato inibire la crescita e indurre l'apoptosi delle cellule derivate dall'epitelio ovarico ed endometriale in vitro [145-149].

Van Themsche ha dimostrato che il TGF- $\beta$  innesca nelle linee cellulari di carcinoma endometriale l'inibizione della proliferazione cellulare [150]. Inoltre usando inibitori dell'RNA ha dimostrato che il TGF- $\beta$  aumenta l'invasività cellulare [150].

### **1.5.0. OSTEOPONTINA**

L'osteopontina (OPN) è una proteina di legame coinvolta in una varietà di funzioni cellulari fisiologiche. È stato dimostrato che gioca un ruolo molto importante nella tumorigenesi, nell'invasione e nella metastatizzazione del carcinoma della mammella, polmone, prostata e colon [151-155].

L'OPN è stata inizialmente implicata nei tumori negli studi in vitro rilevando un aumento dei suoi livelli dopo la trasformazione cancerogena cellulare e dall'osservazione che le cellule tumorali con alto potenziale metastatico presentavano un'espressione aumentata di OPN [156-159].

L'OPN è presente in vari liquidi corporei e gioca un ruolo nella funzione immune e del rimodellamento vascolare [160-162]. Livelli plasmatici elevati di OPN sono stati rilevati in pazienti con neoplasie che presentavano una prognosi infausta [163-166].

Coppola, in 100-59% carcinoma umani ha trovato un aumento significativo della colorazione immuno-istochimica di OPN [167]. L'espressione di OPN è stata trovata significativamente statisticamente direttamente correlate allo stadio tumorale ma non al grado istologico [167].

Nel carcinoma endometriale è stata trovata un aumento della colorazione immunohistochimica dell'OPN direttamente correlato all'espressione ai livelli di mRNA [167].

Un alto score della colorazione immunohistochimica dell'OPN è stato mostrato nel 65% dell'iperplasia endometriale, nel 39% del carcinoma endometriale endometriale, nel 70% del carcinoma endometriale sieroso e in nessun caso di carcinoma endometriale a cellule chiare suggerendo una correlazione indirettamente proporzionale alla prognosi severa [168].

Con l'aumento del grading tumorale aumentavano infatti le aree con bassa espressione di OPN o con completa assenza di OPN nel carcinoma endometriale [168].

L'OPN sembra essere coinvolta nella neoangiogenesi tumorale correlata al VEGF [28].

Nel carcinoma ovarico endometriale, Hashibuchi ha riportato un'iper-espressione di OPN nel 50% dei casi [168].

Tiniakos ha invece mostrato che l'OPN era diminuita o assente nel 93% degli adenocarcinomi ovarici o nelle loro metastasi [169].

In contrasto l'81.5% dei carcinomi ovarici borderline e il 50% degli impianti omentali o linfonodali erano OPN positivi ( $P < .028$ ) supponendo che l'espressione di OPN era correlata ad una prognosi

favorevole [169]. L'istotipo, il grado e lo stadio clinico non erano correlati con l'espressione di OPN [169].

Invece Zhang e Kim hanno evidenziato livelli di espressione di OPN significativamente più alti nel carcinoma ovarico che nel carcinoma ovarico borderline e nei tumori benigni [170-172].

La percentuale positiva di OPN era significativamente più alta nei carcinomi ovarici scarsamente differenziati che rispetto ai G2 e ai G1 e il livello di espressione era significativamente più bassa negli stadi iniziali I-II rispetto agli stadi avanzati III-IV. La percentuale positiva di OPN era associata ad una percentuale più elevata di metastasi linfonodali [170].

### **1.6.0. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR**

I fattori pro-angiogenici comprendono il Fattore di crescita Vascolare Endoteliale (VEGF), il Fattore di necrosi Tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ), l'IL-6 e l' IL-8 mentre i fattori inibenti l'angiogenesi sono l' angiostatina e l' endostatina [172].

L'espressione di VEGF nel carcinoma ovarico è stata studiata da molti autori. In tutti i campioni di carcinoma ovarico era presenti

livelli di VEGF aumentati rispetto al tessuto ovarico benigno di controllo [173].

Negli stadi precoci del carcinoma ovarico un' espressione aumentata di VEGF è stata dimostrata correlata con un ridotta sopravvivenza libera da malattia e una ridotta overall survival [174].

Zhang ha riportato che una stimolazione del VEGF determina un aumento del potere di invasione delle cellule tumorali ovariche in vitro [175]. Byrne ha dimostrato che il blocco del VEGF in modelli animali di carcinoma ovarico inibisce la formazione di ascite e reduce la crescita tumorale [176].

Sia Shen che Hefler hanno dimostrato in 2 studi clinici retrospettivi che l'espressione intratumorale di VEGF e di VEGFR-2 (suo recettore) e il polimorfismo genetico del VEGF sono fattori prognostici indipendenti di prognosi severa nel tumore ovarico [177-178].

Nelle cellule endoteliali umane il CXCL12 è stato trovato stimolare l'aumentata espressione di VEGF e con un feed-back positivo stimolare anche il CXCR4 [31]. E' interessante notare che, nel carcinoma ovarico umano CXCL12 e VEGF inducono sinergisticamente una neovascolarizzazione nel microambiente peritumorale [37]. Inoltre l'inibizione dell'asse CXCL12/ CXCR4 è



stato dimostrato ridurre la crescita dei tumori gastrointestinali tramite la soppressione della neoangiogenesi [42].

Il VEGF, oltre a stimolare la neoangiogenesi, stimola anche la linfangiogenesi correlata con un aumento delle metastasi linfonodali nel carcinoma della mammella, dell'ovaio, dell'endometrio e della cervice uterina [179-181].

Koukourakis ha evidenziato che i livelli sierometrici di VEGF erano significativamente maggiori nelle pazienti con tumore dell'endometrio rispetto ai controlli sani o con leiomiomi [182].

Il VEGF sierometrico era aumentato nelle pazienti con patologie ginecologiche benigne ma non statisticamente significativo rispetto ai controlli sani. Nell'iperplasia endometriale i livelli erano minimamente aumentati [182].

Dobrzycka ha confermato questi dati: i livelli ematici di VEGF erano significativamente più elevati nelle pazienti con carcinoma endometriale di tipo I e II rispetto ai controlli normali. Nel carcinoma di tipo I i livelli però si correlavano con lo stadio [183].

Alcuni autori, nel carcinoma endometriale, hanno evidenziato che la densità microvascolare era correlata con l'estensione della malattia in modo direttamente proporzionale e con la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da malattia in modo inversamente proporzionale [184-186].

Pengchong ha dimostrato nel carcinoma endometriale una associazione tra incremento del VEGF correlato all'incremento di metastasi linfonodali ma nessuna associazione con lo stadio di malattia e il grado istologico [187].

Takahashi, dopo aver trapiantato in topi il tumore dell'endometrio, inducendo un aumento di 10 volte del VEGF ha evidenziato un incremento significativo delle metastasi linfonodali rispetto al gruppo di controllo con normali livelli di VEGF [188]

## **1.7. OBIETTIVO DELLO STUDIO**

### **1.7.1. Obiettivo Primario**

Analizzare l'espressione dell'mRNA di alcune citochine, chemochine e loro recettori e di alcuni fattori di crescita, estratto da campioni di carcinoma originato da endometrio umano e confrontarli con l'mRNA estratto da campioni di tessuto endometriale normale omologo (dalla stessa paziente) al fine di caratterizzare le variazioni del microambiente tumorale del carcinoma endometriale rispetto al tessuto endometriale sano.

### **1.7.2. Obiettivo secondario**

In base ai risultati evidenziare i fattori più interessanti presenti nell'ambiente peritumorale del carcinoma endometriale per programmare uno studio prospettico con una casistica maggiore.

## **2.0.MATERIALI E METODO**

### **2.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI DI TESSUTO**

2.1.1. **Raccolta dei Campioni.** Presso l'istituto Clinico di Ricerca a Carattere Scientifico ICCS Humanitas di Rozzano, da pazienti sottoposte a chirurgia primaria per carcinoma dell'endometrio, sono stati prelevati sterilmente (per evitare qualsiasi contaminazione con altro materiale biologico di altra origine):

A) un campione di carcinoma endometriale di cui una parte inviata per esame istologico

B) un campione da tessuto endometriale della stessa paziente di cui una parte inviata per esame istologico, come controllo.

2.1.2. **Raccolta parametri clinici e chirurgici.** Tutti i parametri clinici e chirurgici sono stati raccolti in un database.

2.1.3. **Trattamento con RNA later e conservazione.** I campioni sono stati immediatamente immersi in RNA later (Ambion) per 24-36 ore a 4 °C e successivamente asciugati e conservati a -80° nel laboratorio di Ricerca Dell'IRCCS Humanitas di Rozzano (responsabile dello studio Prof.ssa Paola Allavena).

Tutte le pazienti hanno acconsentito a partecipare allo studio e firmato il consenso informato. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Clinico Humanitas.

## 2.2. ESTRAZIONE DELL' RNA

- 2.2.1 0.5 cm di tessuto è stato sminuzzato e omogeneizzato
- 2.2.2 Il tessuto omogeneizzato è stato unito ad 1 ml di trizol e mischiato accuratamente
- 2.2.3 Sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e, dopo averla vortexata, la vial è stata lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti
- 2.2.4 Le vials sono state centrifugate a 10.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente
- 2.2.5 Da ogni vial è stata aspirata la parte acquosa contenente l'mRNA e messa in una vial pulita evitando la parte sedimentata accuratamente (circa 500 µl)
- 2.2.6 Un volume uguale (circa 500 µl) di isopropanolo (la cui azione è di far precipitare l'RNA presente nella soluzione) è stato aggiunto ad ogni vial. Le vials sono state vortexate e lasciate 10 minuti a temperatura ambiente.
- 2.2.7 Ogni vial è stata centrifugata per 10 minuti a 10.000 rpm a temperatura ambiente.
- 2.2.8 Da ogni vial è stato aspirato tutto il liquido, senza prendere il pellet in fondo dove si trovava l'RNA.
- 2.2.9 Il pellet rimasto in ogni vial è stato lavato e risospeso con 1 ml di etanolo al 70%

2.2.10 Le vials sono state centrifugate a 10.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente

2.2.11 Tutto l' etanolo è stato aspirato e buttato da ogni vial lasciando il pellet ad asciugare a temperatura ambiente

2.2.12 Infine il pellet contenente l'RNA è stato risospeso con 30 µl di H<sub>2</sub>O e congelato a -80 °C.

### **2.3. QUANTIFICAZIONE DELL'RNA**

L' RNA è stato quantificato mediante Nanodrop spettrofotometro ND-1000 e la sua qualità è stata esaminata mediante elettroforesi proteica con 1.5% gel di agarosio. Sul tabulato la macchina legge la concentrazione di ogni campione in ng/µl (1 µg è uguale a 1000 ng).

### **2.4. RETROTRASCRIZIONE DEL RNA IN cDNA.**

1 ng di RNA totale è stato quindi retro-trascritto usando un kit ad alta capacità (Applied Biosystems) seguendo le istruzioni del produttore, trattato con DNase I, quantificato e revers-trascritto in cDNA usando degli oligo-dT primers.

Come primo tempo si prepara la 1) Mix e 2) le diluizioni di RNA con l'H<sub>2</sub>O dei campioni di tumore e di tessuto endometriale sano.

### 2.4.1. Preparazione della MIX

Per ogni campione la mix deve avere un volume totale di 7.75  $\mu$ l. Devo sempre calcolare come numero di campioni almeno 2 campioni in più. Es. per 8 campioni calcolarne 10, quindi  $7,75 \times 10 =$  totale di 77,5  $\mu$ l.

<b>BUFFER</b>	2.5 $\mu$ l x il num. dei campioni 8 + 2	= 25 $\mu$ l
<b>RANDOM PRIMER</b> (Sequenza di DNA che si attacca all'RNA per iniziare la trascrizione)	2.5 $\mu$ l x il num. dei campioni 8 + 2	= 25 $\mu$ l
<b>DNTpMIX</b> (basi azotate)	1 $\mu$ l x il num. dei campioni 8 + 2	= 10 $\mu$ l
<b>RT</b> Tolti dal freezer per ultima	1,25 $\mu$ l x il num. dei campioni + 2	= 12,5 $\mu$ l
<b>RI</b> Rnase inhibitor Tolti dal freezer per ultimi	0,5 $\mu$ l x il num. dei campioni + 2	= 5 $\mu$ l
<b>Totale volume della MIX</b>		77,5 $\mu$ l

### 2.4.2. Diluizioni dell' RNA

#### 2.4.3. Prendere 1 ng di RNA da ogni campione.

Per sapere quanti  $\mu$ l devo prendere per avere 1 ng di RNA finale per ogni campione di tessuto sano e tumore devo fare:

1000: concentrazione in ng/ $\mu$ l della quantificazione dell'RNA

Se la concentrazione in ng/μl alla quantificazione dell'RNA è troppo elevata (superiore a 800-1000) conviene diluirla in modo tale da avere una concentrazione intorno agli 800-900 ng/μl.

Per esempio:

Se la concentrazione di RNA di un dato campione è di 4388,05 ng/μl, farò una diluizione 1:5, e cioè'

$$4388,05 : 5 = 877,61 \text{ ng/}\mu\text{l (1 } \mu\text{l di RNA e 4 } \mu\text{l di H}_2\text{O)}$$

Quindi, se la concentrazione di RNA di quel campione è diventata di 877,61 ng/μl, per avere 1 ng dovrò fare:

$$1000 : 877,61 = \mathbf{1.1 \mu\text{l}}$$

Prendendo 1.1 ml avrò 1 ng di RNA di quel campione.

#### 2.4.4. Volume finale della diluizione di RNA.

Il volume finale della diluizione di RNA deve essere **17,25 μl** contenente 1 μg di RNA:

Per esempio:

$$17,25 \mu\text{l} - 1,1 \mu\text{l} (= 1 \mu\text{g di RNA}) = 16,15 \mu\text{l di H}_2\text{O}$$

Mettero' quindi nella nella gilson da 0.2 ml:

1.1 μl di RNA e 16,15 μl di H<sub>2</sub>O per un volume totale di 17,25 μl.



Calcolo così tutte le diluizioni di RNA per tutti i campioni (sano e tumore) e li metto nelle varie provette.

**2.4.5 Preparazione volumi finali.** In ogni provetta in cui erano stati messi 1 ng di l'RNA dei vari campioni con un volume finale di 17,25 µl sono stati aggiunti 7,75 µl di MIX e in totale in ogni gilson aveva 25 µl di volume finale.

2.4.6. Le provette sono state messe nella piastra del termociclatore, impostato il programma di PCR per un ora e mezzo fino a conclusione della reazione di retrotrascrizione del cDNA. Per ogni segmento di RNA si forma un segmento di cDNA complementare ottenendo così il cDNA equivalente a tutto l'RNA estratto dai campioni di tessuto.

2.4.9. Le provette sono state conservate a -80 °C.

## 2.5. REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

(DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI cDNA DI OGNI CAMPIONE).

Per ogni campione A e B, per determinare i livelli relativi di cDNA dei vari geni studiati (CXCL12, CXCR4, CXCL8, CXCL11, CXCR7, TNF, IL6, MIF, TGF $\beta$ , OPN, VEGF, MIF, VEGF), è stata usata la tecnica **Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction** (RQ-PCR) usando SYBER Green I come mezzo di rilevazione.

Il metodo è basato sulla capacità della doppia elica di DNA di dissociarsi in due eliche singole quando è scaldata a 80-100°C. Questo processo è noto come "denaturazione". Successivamente la doppia elica può ricostituirsi, partendo dalle due singole eliche complementari incubate in condizioni idonee. Tale ricostruzione è chiamata "Ibridizzazione" (Se una delle due eliche è marcata, è possibile infine visualizzare l'avvenuta ibridizzazione).

Questa tecnica serve ad identificare specifiche sequenze di DNA o RNA.

La piastra conteneva 8 linee di 12 camere ciascuna per un totale di 96 camere.

Sono stati utilizzati dei primer gene-specifici per 13 geni correlati all'infiammazione da Applied Biosystems Assays-on-

Demand TM Gene Expression Products (CXCL12, CXCR4, CXCL8, CXCL11, CXCR7, TNF, IL6, MIF, TGF $\beta$ , OPN, VEGF, MIF, VEGF), e un gene (18S) con 2 campioni in triplicato per ogni paziente (2 pazienti per ogni piastra).

### **2.5.1. Preparazione di 13 mix di Primer per ogni gene dell'mRNA da esaminare**

2.5.1.1. La quantità di mix per ogni gene dell'mRNA doveva essere sufficiente per 8 pozzetti (3 per il tessuto sano e 3 per il tessuto tumorale + 2 di sicurezza) con un volume finale di **15,5  $\mu$ l** per ogni campione (x 8 = in totale 124  $\mu$ l di mix di Primer per ogni gene target).

2.5.1.2. Sono state preparate 13 vial per ogni gene target. In ogni vial sono stati messi 12,5  $\mu$ l di SYBER GREEN x 8 pozzetti = 100  $\mu$ l e 3  $\mu$ l di PRIMER di uno dei geni per l'mRNA esaminati x 8 pozzetti = 24  $\mu$ l

### **2.5.2. Preparazione della mix1 di cDNA del tessuto endometriale normale di una paziente**

2.5.2.1. Per 48 pozzetti (42 + 6 di sicurezza), il volume finale di ogni pozzetto doveva essere di 9.5  $\mu$ l, in totale 456  $\mu$ l.

2.5.2.2. Sono stati preparati  $0,5 \mu\text{l}$  CDNA x 48 pozzetti =  $24 \mu\text{l}$  di cDNA normale

2.5.2.3. Sono stati preparati  $9 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O x 48 pozzetti =  $432 \mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O

### **2.5.3. Preparazione della mix2 di cDNA del tessuto endometriale tumorale di una paziente**

2.5.3.1. Per 48 pozzetti (42 + 6 di sicurezza), il volume finale di ogni pozzetto doveva essere di  $9,6 \mu\text{l}$ , in totale  $456 \mu\text{l}$

2.5.3.2. Sono stati preparati  $0,5 \mu\text{l}$  CDNA x 48 pozzetti =  $24 \mu\text{l}$  di cDNA tumorale

2.5.3.3. Sono stati preparati  $9 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O x 48 pozzetti =  $432 \mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O

2.5.4. Nei pozzetti gialli (vedi tab. 2)  $9,5 \mu\text{l}$  della **MIX1**

2.5.5. Nei pozzetti rossi (vedi tab. 2) sono stati messi  $9,5 \mu\text{l}$  della

**MIX2** nelle caselle arancioni

2.5.6. Sono stati messi nei pozzetti bianchi (vedi tab. 2)  $9,5 \mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O (solo primer senza cDNA)

2.5.7. Sono stati messi  $15,5 \mu\text{l}$  della **mix di ogni primer dei geni dell'mRNA** nei pozzetti relativi ad ogni gene (3 per campioni di tessuto normale e 3 per campioni di tessuto tumorale) compresi quelli bianchi come controllo (vedi tab. 3).

Il protocollo di amplificazione usato è stato il seguente: 2 minuti a  $50^\circ\text{C}$  per la glicosilasi dell'uracile-DNA [189]. Dieci minuti

a 94,5 °C (attivazione). 40 cicli di denaturazione a 97 °C per 30 secondi e temperatura di annealing con estensione a 59,7 °C per 1 minuto.

**Tab 2.** Esempio della piastra per la quantificazione dell'espressione del cDNA ottenuto da mRNA estratto da ogni campione.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	S	S	S	T	T	T	S	S	S	T	T	T
a	18S	18S	18S	18S	18S	18S	CXCL12	CXCL12	CXCL12	CXCL12	CXCL12	CXCL12
b	CXCL11	CXCL11	CXCL11	CXCL11	CXCL11	CXCL11	CXCR4	CXCR4	CXCR4	CXCR4	CXCR4	CXCR4
c	CXCR7	CXCR7	CXCR7	CXCR7	CXCR7	CXCR7	MIF	MIF	MIF	MIF	MIF	MIF
d	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1	SPARC	SPARC	SPARC	SPARC	SPARC	SPARC
e	IL6	IL6	IL6	IL6	IL6	IL6	TNF	TNF	TNF	TNF	TNF	TNF
f	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	TGFβ	TGFβ	TGFβ	TGFβ	TGFβ	TGFβ
g	IL1	IL1	IL1 SP	IL1	IL1	IL1	CXCL8	CXCL8	CXCL8	CXCL8	CXCL8	CXCL8
h	18s SP	CXCL12 SP	CXCL11 SP	CXCR4 SP	CXCR7 SP	MIF SP	OPN SP	SPARC SP	IL6 SP	TNF SP	VEGF SP	TGFb SP

### Legenda

**N:** tessuto normale, **K:** tessuto tumorale, **SP:** solo primer senza cDNA

La quantificazione dell'espressione di ogni gene dell'mRNA target (chemochina o citochina o fattore di crescita) relativa al gene housekeeping gene (18S) è stata calcolata come segue:

$$2^{-DCt}, \text{ dove } DCt = Ct - Ct \text{ gene housekeeping}$$

L'incremento o decremento di ogni gene dell'mRNA target è stato calcolato come segue:

$$2^{-DDCt}, \text{ dove } DDCt = DCt \text{ target gene (A)} - DCt \text{ target gene (B)}$$

(A) tessuto tumorale

(B) tessuto normale

La soglia ciclo Ct era data automaticamente dal software (Applied Biosystems).

### **Analisi statistica**

La significativita' tra le medie del livello di espressione dei diversi geni nel tessuto tumorale verso quello normale di controllo è stata determinata mediante il T-student Test. Il valore di P inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo con un livello di significativita' del 95% .

### **3.0 RISULTATI**

Quindici pazienti con carcinoma endometriale sono state arruolate nello studio.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a chirurgia primaria con isterectomia totale con annessiectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica. Tre pazienti sono uscite dallo studio: una perché il materiale prelevato aveva subito dei danni durante la conservazione e quindi non è stato possibile processarlo, una paziente perché non ha più presentato tumore residuo (dopo la biopsia diagnostica) all'esame istologico postoperatorio e una paziente perché ha presentato solo iperplasia ghiandolare senza atipie all'esame istologico postoperatorio.

Un totale di 12 pazienti sono state prospetticamente arruolate nello studio. Le caratteristiche cliniche delle pazienti sono riportate nelle tabelle 3 e 4.

Tre pazienti (25%) sono state sottoposte a radioterapia pelvica e chemioterapia adiuvante postoperatoria e una paziente (8%) a radioterapia pelvica postoperatoria.

La mediana della sopravvivenza libera da malattia clinica e strumentale, con un FU di 3 anni, è stata di 24 mesi (range 18-36) con una sola paziente che ha recidivato a 18 mesi (vedi tabella 4).



**Tab. 3.** Caratteristiche cliniche in un totale di 12 pazienti

<b>No. Pazienti</b>	12
<b>Mediana Eta'</b> (anni)	63 (range 53-81)
<b>Mediana BMI</b> (Kg/m <sup>2</sup> )	28 (range 25-31)
<b>FIGO stage I</b>	9 (75%)
IA	8 (66.6%)
IB	1 (8.3%)
<b>FIGO stage III</b>	3 (25%)
III A	2 (16.6%)
III C	1 (8.3%)
<b>Istotipo</b>	
Endometrioide	8 (66.6%)
Cellule chiare	2 (16.6%)
Villoghiandolare	1 (8.3%)
Endometrioide con differenziazione squamosa	1 (8.3%)

**Tab. 4.** Caratteristiche cliniche delle pazienti

<b>Pt.</b>	<b>età</b>	<b>FIGO stage</b>	<b>LVS</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>Istotipo</b>	<b>terapia adiuvante</b>	<b>DFS mesi</b>
1	58	IA	-	-	G2	AE	FU	24
2	66	IA	-	-	G3	AE	FU*	30
3	65	IA	-	-	G3	ACC	PAC + RT	32
4	75	IA	-	-	G1	AV	FU	36
5	63	IA	-	-	G2	AE	FU	35
6	58	IA	-	-	G2	AE	FU	23
7	68	IA	-	-	G2	AE	FU	24
8	61	IA	-	-	G2	AE	FU	36
9	81	IB	-	-	G2	AE	FU	22
10	53	IIIA	-	-	G2	AS	PAC + RT	25
11	81	IIIA	+	-	G2	ACC	CT +RT	18*
12	63	IIIC	+	+	G2	AE	RT	23

**PAC:** Cisplatino, Paclitaxel **CT:** Carbo Taxolo

**RTp:** Radioterapia pelvica

**RTb:** brachiterapia

**AE:** Adenocarcinoma Endometrioido

**ACC:** Adenocarcinoma Cellule Chiare

**AV:** adenocarcinoma Villoghiandolare

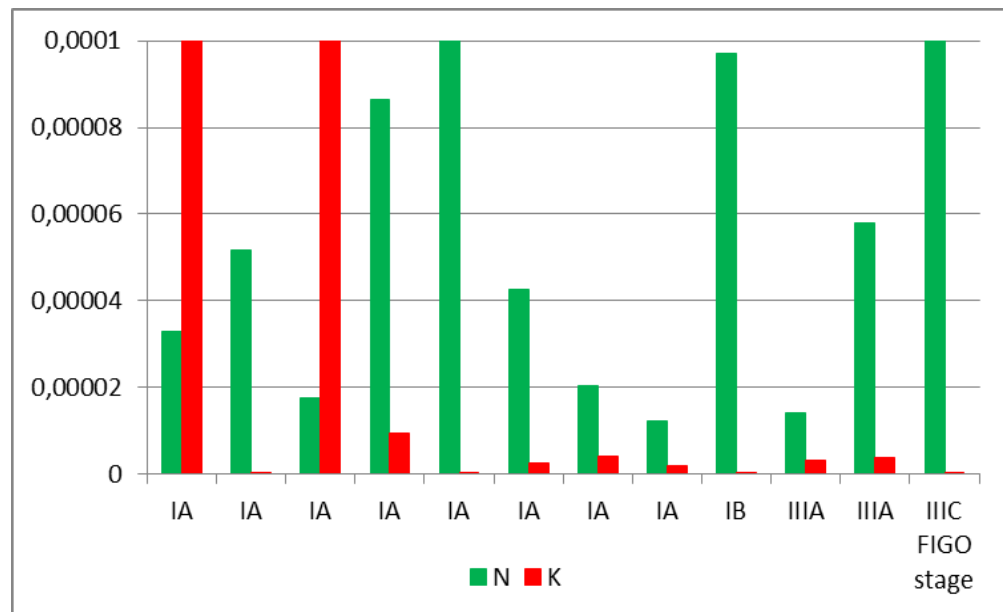
**AS:** Adenocarcinoma Squamoso

\*La paziente ha rifiutato RT

° recidiva a 18 mesi addoio-pelvica con ascite

Nel tessuto tumorale endometriale umano, rispetto al tessuto di controllo sano, è stata evidenziata, un' inibizione dell'espressione dell'mRNA del gene del CXCL12 nell'83% delle pazienti, eccetto che in un caso di carcinoma a cellule chiare G3 stadio IA e un caso di carcinoma endometriale G2 stadio IA (vedi tab. 5). E' stata osservata un'inibizione del CXCL12 mRNA statisticamente significativa nelle pazienti con infiltrazione del miometrio > 50% ( $P= .003$ ).

**Tab. 5:** CXCL12 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale

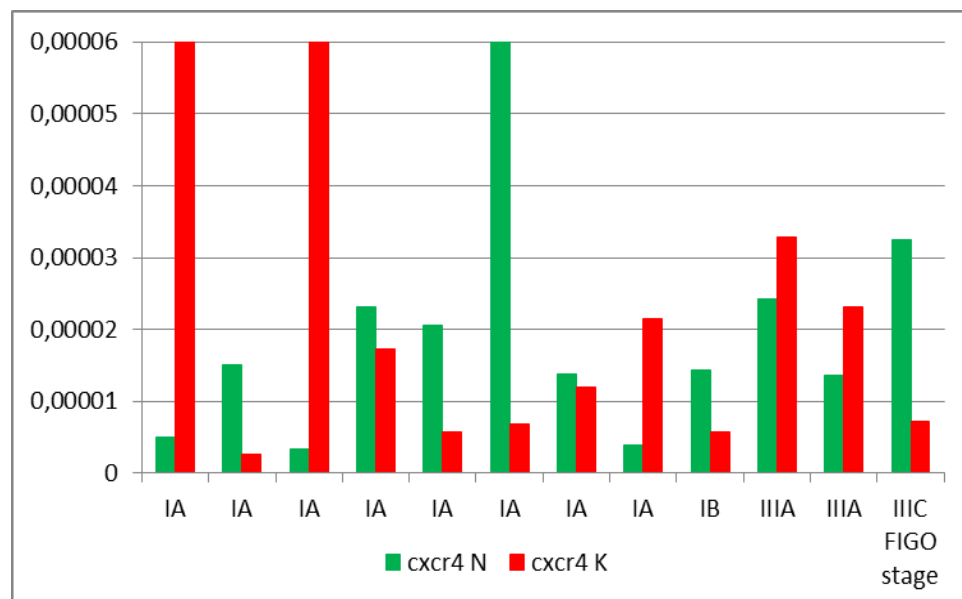


Si osserva un'inibizione del CXCL12 mRNA nell'83% delle pazienti. Nelle pazienti con infiltrazione del miometrio > 50% l'inibizione dell'mRNA del CXCL12 nel tessuto tumorale rispetto a quello sano era statisticamente significativa ( $P= .003$ ).

Il livello di espressione ridotto del CXCL12 era correlato in maniera direttamente proporzionale alla riduzione dell'espressione del CXCR4 nel 75% dei casi, con un RR=3 (CI 95% 0.84-10.72).

E' stata evidenziata comunque una inibizione dell'espressione genica dell'mRNA del CXCR4 nel 58% dei casi (vedi Tab. 6).

**Tab. 6:** CXCR4 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale.

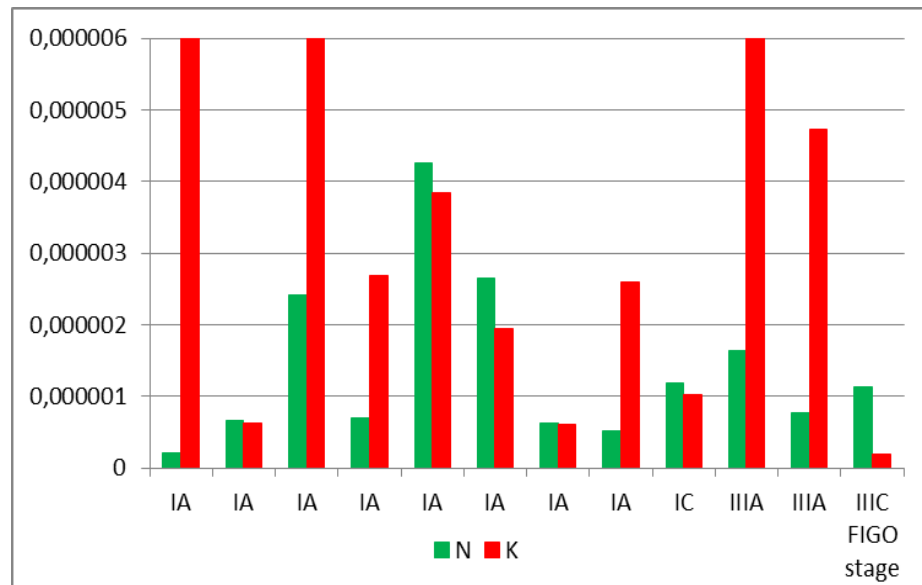


Il livello di espressione dell'mRNA del tessuto tumorale, rispetto a quello sano, era diminuito nel 58%.

Il livello di espressione dell'mRNA del CXCL11 (fattore angiostatico) è risultato iperespresso nel 62% delle pazienti con infiltrazione miometriale < al 50% e nel 50% di quelle con infiltrazione > del 50%.

Il livello di espressione del CXCL12 mRNA è risultato essere direttamente proporzionale a quello del CXL11 nel 67% dei casi (tab. 7).

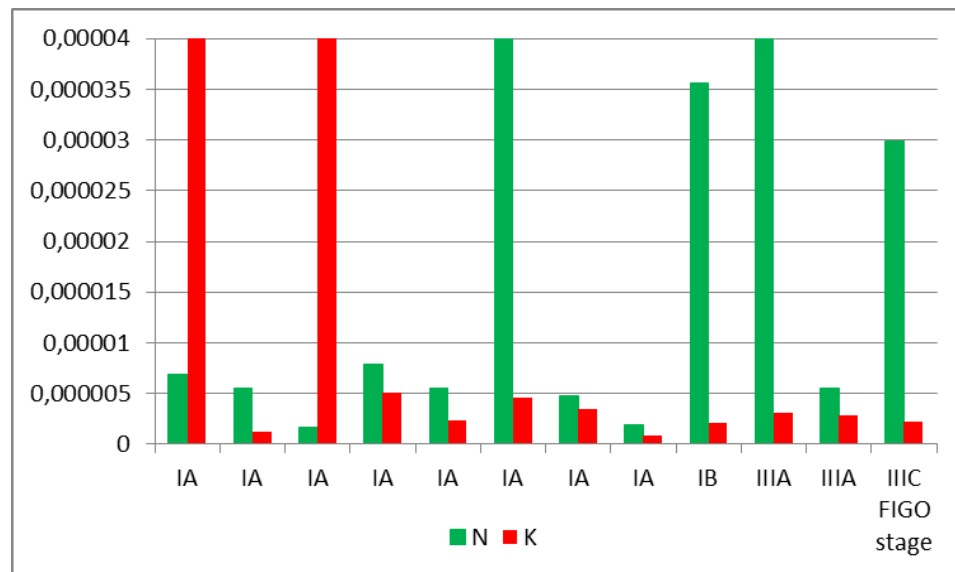
**Tab. 7** : CXCL11 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



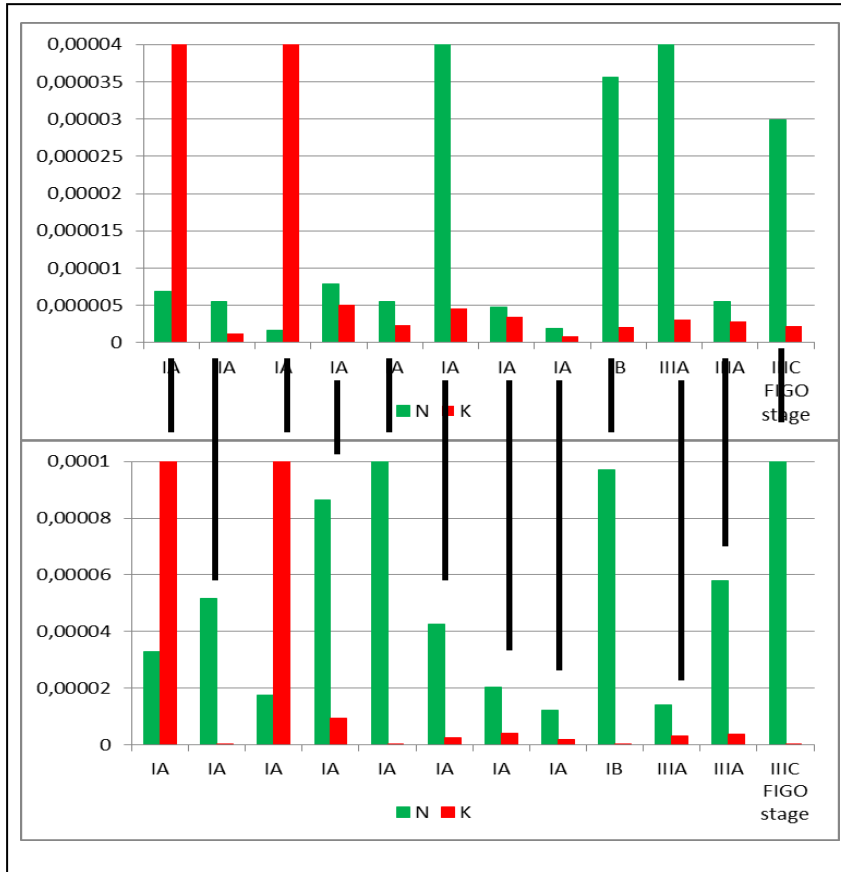
Il livello di espressione dell'mRNA del CXCR7 era ridotto nel tessuto tumorale rispetto a quello sano nell'67% dei casi con invasione mioemtriale < 50% e nel 100% dei casi con invasione miometriale > 50%.

CXCL12 era invece significativamente direttamente correlato a quello del CXCR7 nel 100% dei casi (P=0.000), (vedi Tab. 8 e 9).

**Tab. 8:** CXCR7 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale.



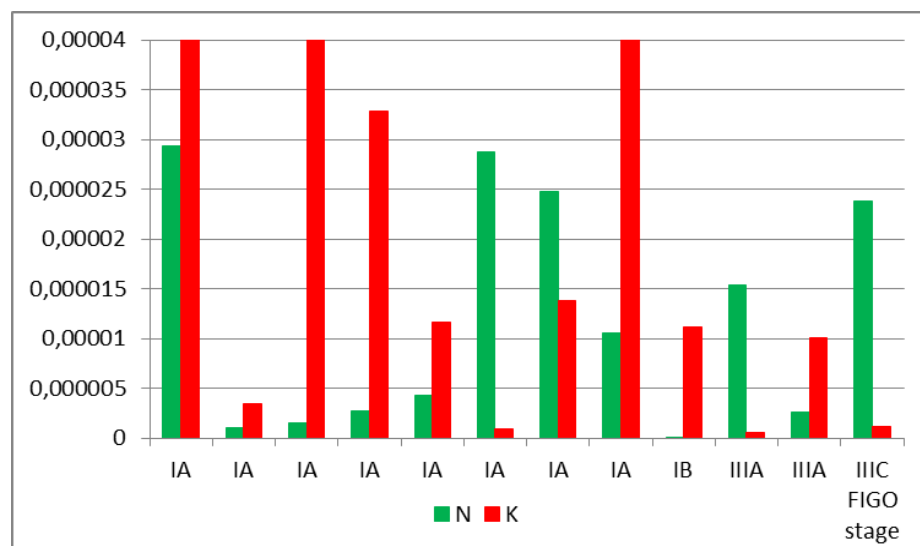
**Tab. 9:** Correlazione tra CXCR7 e CXCL12 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale.



Il livello di espressione dell'mRNA del CXCL12 è direttamente correlato a quello del CXCR7 nel 100% dei casi (P=0.000).

L'mRNA del CXCL8 era iperespresso nel 66% dei casi del tessuto tumorale endometriale rispetto a quello sano (tab. 10).

**Tab. 10** : CXCL8 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



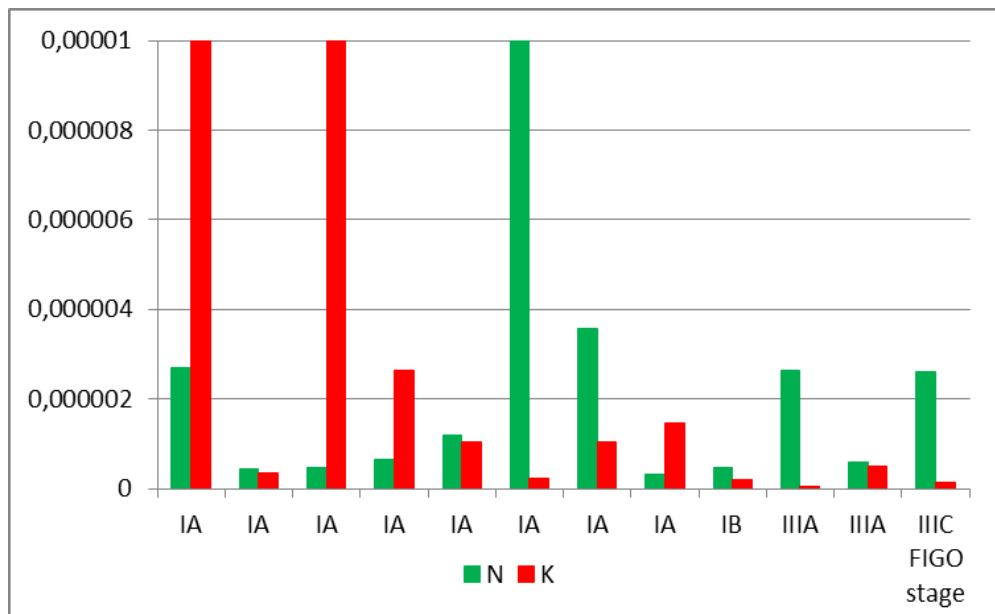
L'mRNA del TNF è risultato down-regolato nel 67% dei casi, ed in particolare, nel 100% delle pazienti in cui l'invasione miometriale era > 50% versus il 50% delle pazienti con infiltrazione del miometrio < 50% (vedi tab. 11) con un trend di significativita' (P<.09) .



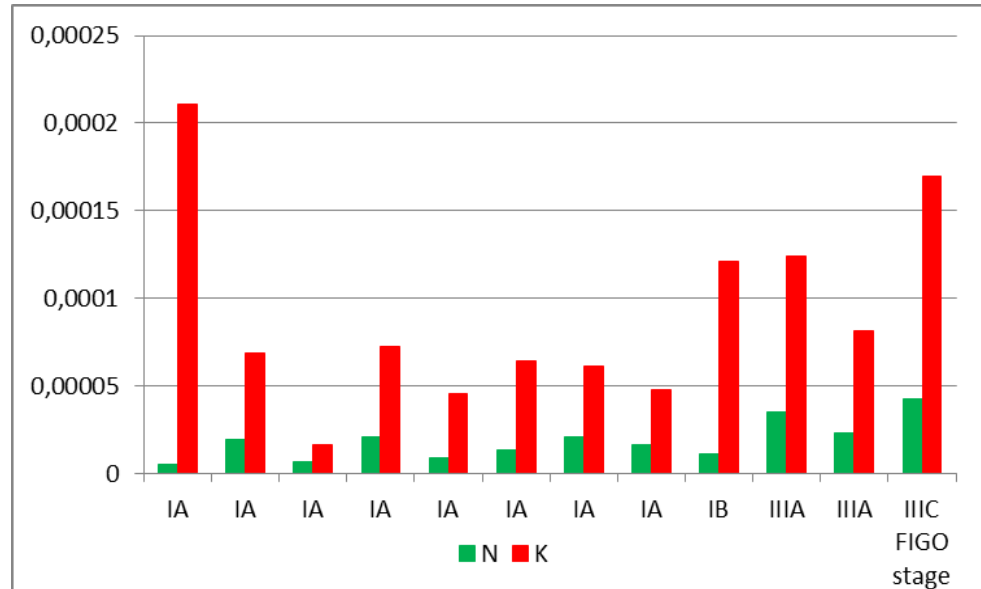
L' up-regolazione e la down-regolazione del TNF mRNA era correlata in maniera direttamente proporzionale al livello di espressione del CXCL8, nel 75% dei casi .

Sempre nel 75% dei casi un incremento o una riduzione di espressione del TNF mRNA era direttamente correlato al livello di espressione del CXCR4 .

**Tab.11:** TNF mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



**Tab.12.:** MIF mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



Il livello di espressione del MIF mRNA è inibito nel tessuto tumorale rispetto a quello sano nel 100% dei casi ( $P < .001$ ).

La down regolazione del TNF mRNA era anche correlata ad una up-regolazione del MIF nel 67% dei casi ( vedi tab. 12) .

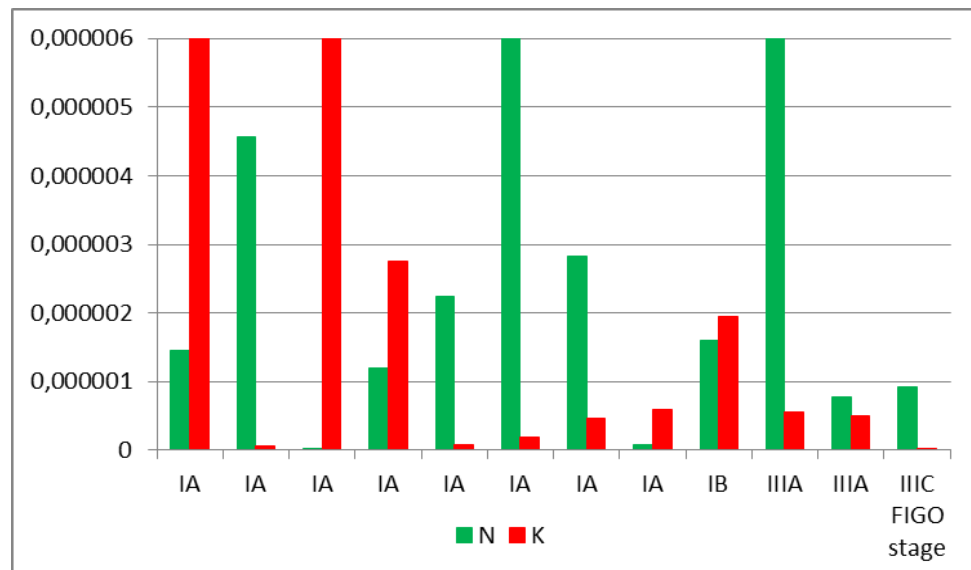
Infine, i livelli di espressione del TNF erano correlati a quelli del VEGF nel 67% dei casi .

Un basso livello di espressione dell'mRNA dell' IL6 è stato evidenziato nel 100% degli stadi avanzati versus il 45% degli stadi iniziali nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano,  $P < .05$  (vedi tab 13).

Inoltre i livelli di espressione dell'IL6 erano correlati nel 75% dei casi significativamente in maniera direttamente proporzionale ai

livelli di CXCL8 ( $P < .05$ ), nel 92% dei casi ai livelli di TNF mRNA ( $P=NS$ ) e nel 75% ai livelli di CXCL12 mRNA ( $P=NS$ ).

**Tab. 13:** IL6 mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



Un'inibizione del livello di espressione dell'mRNA dell'IL6 nel tessuto tumorale rispetto al sano, è stato evidenziato nel 100% degli stadi avanzati versus il 45% degli stadi iniziali nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano,  $P < .001$ .

Il **MIF** mRNA aveva un'elevata espressione nel 100% dei casi nel tessuto tumorale rispetto a quello sano, statisticamente significativa,  $P < .001$  (vedi tab.12).

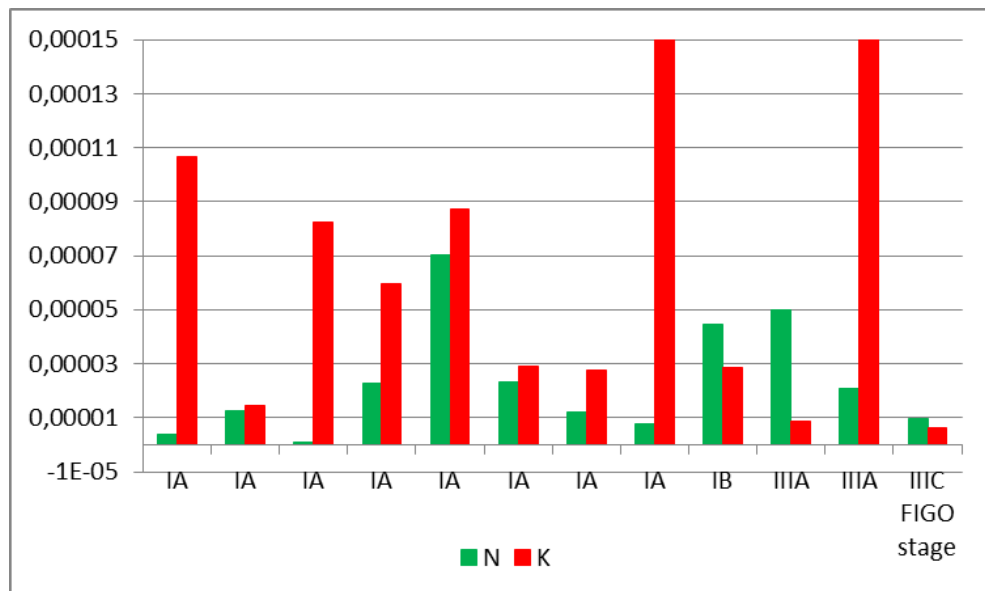
La up-regolazione dell'mRNA del MIF era direttamente proporzionale a quella dell'OPN nel 75% dei casi e in particolare nel

100% dei casi di invasione tumorale miometriale < 50% (vedi tab. 14).

L'up-regolazione del MIF mRNA era indirettamente proporzionale a quella del TGFβ in modo statisticamente significativo, P<.05 (vedi tab.15).

Inoltre, l' elevata espressione del MIF era correlata in modo direttamente proporzionale a quella del VEGF solo nel 58% dei casi e solo nel 50% dei casi ad alto rischio (G3, istotipo cellule chiare e squamoso, stadio avanzato, M>50%), (vedi tab. 16).

**Tab.14** : OPN mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale

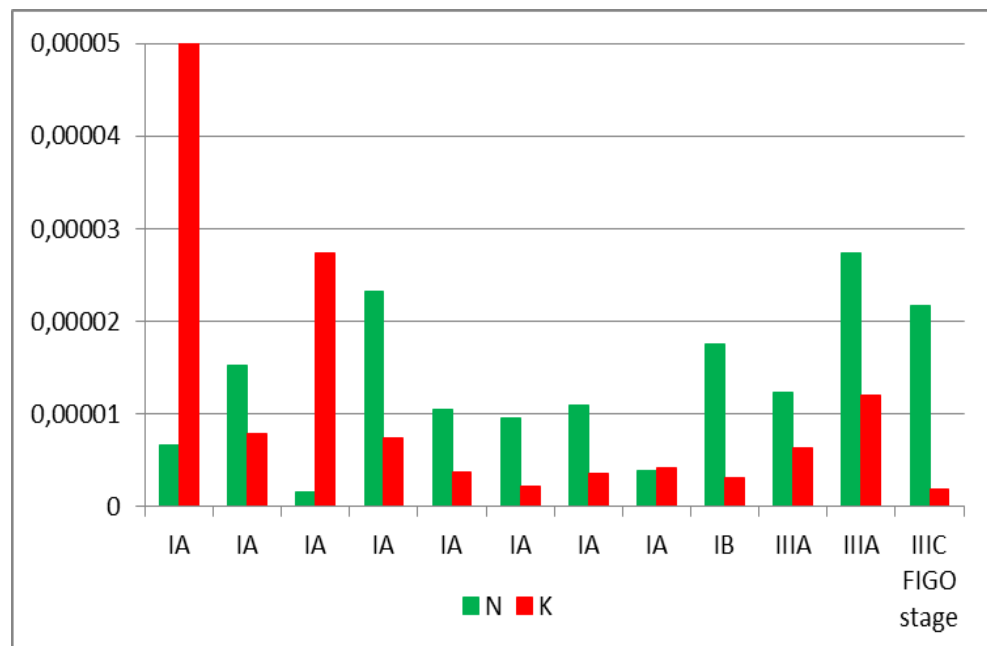


TGFβ era down-regolato nel 83% dei casi nel tumore rispetto al tessuto sano (P=NS).

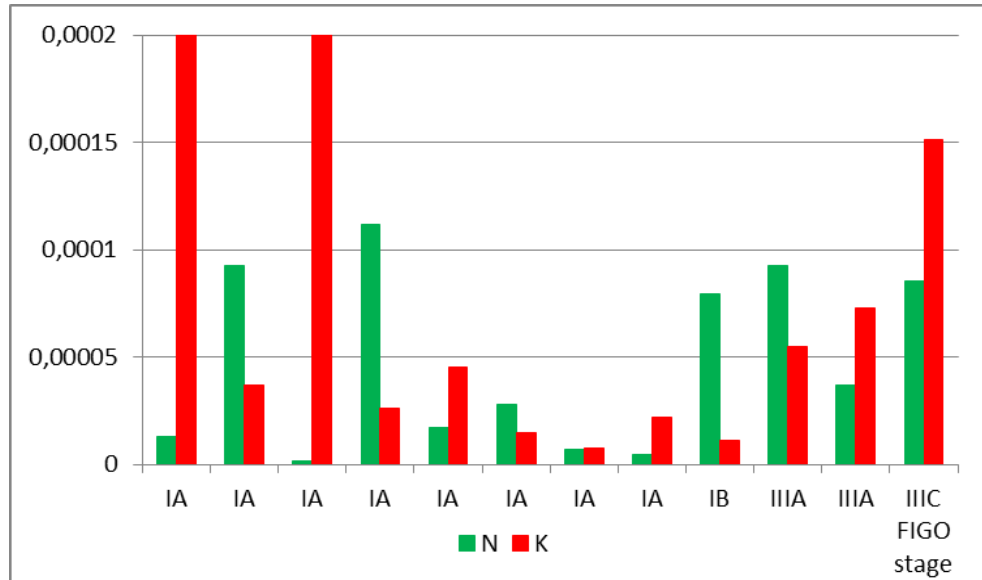
Nei casi in cui il TGFβ era iper-espresso corrispondeva un aumento direttamente proporzionale del VEGF solo in due pazienti.

I livelli di TGFβ erano direttamente correlati a quelli di IL6 nel 75% dei casi.

**Tab 15** : TGFβ mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



**Tab. 16:** VEGF mRNA nell'endometrio normale e nel carcinoma endometriale



L' OPN era iperespressa nel 100% dei tumori con invasione del miometrio < 50% ( $P < 0.01$ ), mentre era down-regolata nei tumori rispetto all'endometrio sano, nel 75% delle pazienti con infiltrazione del miometrio > 50% ( $P = NS$ ).

Il VEGF mRNA era down-regolato nel 55% dei casi nel tessuto tumorale rispetto a quello sano negli stadi iniziali, mentre risultava iper-espresso nel 33% degli stadi avanzati.

## 4.0 DISCUSSIONE

In questo studio vengono esaminate una vasta gamma di chemochine, citochine e fattori di crescita presenti nel tessuto tumorale endometriale implicati nella carcinogenesi, neoangiogenesi, linfangiogenesi e metastatizzazione.

Nel tessuto tumorale endometriale umano, rispetto al tessuto di controllo sano, è stata evidenziata, contrariamente a quanto riportato in generale in Letteratura in altri tumori, un' inibizione dell'espressione dell'mRNA del gene del CXCL12 nell'83% delle nostre pazienti [4,68]. La down regolazione del CXCL12 potrebbe corrispondere ad un andamento poco aggressivo del tumore, confermato dall'assenza di recidive nel primo stadio a 3 anni di FU.

La down-regolazione del CXCL12, correlato in maniera direttamente proporzionale alla down-regolazione del CXCR4 nel 75% dei casi, conferma l'ipotesi dell'esistenza dell'asse CXCL12 - CXCR4 nel tessuto tumorale endometriale (vedi tabella 5-6) [12, 54-60].

Secondo Tsukamoto un'elevata espressione dell'asse CXCL12-CXCR4 era correlata con un'infiltrazione del miometrio > 50%, ed in

effetti nella nostra serie il 75% delle pazienti con M< 50% presentava una down-regolazione del CXCL12 e il 62% anche del CXCR4.

Nel nostro studio non abbiamo trovato correlazione con l'espressione di mRNA del CXCL12 /CXCR4 col il grading tumorale, come invece riportato da Mizolami e Kodama [69-79].

Gelmini ha dimostrato, nel carcinoma endometriale, che l'inibizione del CXCR4 mediante anticorpi bloccanti determinava una diminuzione delle metastasi peritoneali mentre quelle epatiche e polmonari erano addirittura completamente inibite [71].

Grunenwald ha dimostrato che l'inibizione del CXCL12, tramite il VEGF, determinava un'inibizione della angiogenesi in vivo [46]. Su queste basi potrebbero essere messi a punto dei protocolli clinici di terapia, particolarmente nelle pazienti a medio-alto rischio.

Il livello di CXCL12 non mostrava un'evidente correlazione con il CXCL11, che è un noto fattore angiostatico.

Il livello di espressione dell'mRNA del CXCL12 era invece significativamente direttamente correlato a quello del CXCR7 nel 100% dei casi ( $P=.000$ ). Questi dati confermano quanto riportato da altri autori sul collegamento tra metastasi e angiogenesi, attraverso



l'asse CXCL12 –CXCR4, visto che alcuni studi dimostrano che l'inibizione di questo asse riduce la crescita dei tumori mediante la soppressione dello stimolo angiogenetico, mentre il CXCL12, legandosi al recettore CXCR7, facilita le metastasi linfatiche e promuove la crescita tumorale [41,54-55]. Il dato concorda di nuovo con l'andamento favorevole della malattia nelle pazienti della serie in studio.

E'interessante notare che i livelli di CXCL11 (angiostatico) e CXCL8 (stimolante l'angiogenesi) erano inversamente proporzionali soltanto nel 40% dei casi mentre ci saremmo aspettati di trovarli inversamente proporzionali in una percentuale vicina al 100%.

Questo risultato è interpretabile forse col fatto che, anche se il CXCL11 è iperespresso esistono altri fattori che riescono ad indurre lo stimolo angiogenetico ed imprimere un feed back positivo alla trascrizione del CXCL8.

La down-regolazione dell'mRNA del TNF nel 66% dei casi potrebbe essere indicativa di una buona risposta immunitaria delle pazienti al tumore, confermata dall'andamento della sopravvivenza libera da malattia. La down-regolazione dell'mRNA del TNF, correlata alla profondità di invasione del miometrio > del 50% nel

100% dei casi confermerebbe quanto riportato in Letteratura sulla promozione tumorale esercitata sulle cellule neoplastiche in situ del TNF con basse concentrazioni (diverso dall' aumento del TNF a livello sierico) [92].

L'incremento, o la riduzione del TNF mRNA, correlati in maniera direttamente proporzionale al livello di espressione del CXCL8 nel 75% dei casi, confermerebbe, nel carcinoma endometriale, i risultati già pubblicati da Yao sul carcinoma polmonare dove l'aumento del CXCL8 era correlato ad invasività ed angiogenesi, ed era dose dipendente dall'incremento del TNF [74].

Nel 75% dei casi il TNF mRNA era direttamente correlato al livello di espressione del CXCR4, confermando per il carcinoma endometriale i dati pubblicati da Kulbe nel carcinoma ovarico epiteliale [92].

Infine i livelli di espressione del TNF correlati a quelli del VEGF nel 67% dei casi confermano per il carcinoma endometriale i dati di Kulbe, già pubblicati sul carcinoma ovarico, che dimostrano una riduzione significativa del VEGF mediante inibizione del TNF [99].

L' IL6 mRNA è risultato down-regolato nel 100% degli stadi avanzati e nel 45% degli stadi iniziali nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano. Questo risultato è in contraddizione con quanto riportato in letteratura per altre neoplasie dove i livelli di IL6 aumentati sono associati a prognosi severa nel carcinoma ovarico [101], l'IL6 promuove la crescita tumorale ed è antiapoptotica [102-104].

Invece, i dati sui livelli di espressione dell' IL6 significativamente correlati in maniera direttamente proporzionale ai livelli di CXCL8 e ai livelli di TNF mRNA e CXCL12 mRNA confermano l'ipotesi dell'esistenza del TNF-network che può quindi gettare la base per poter utilizzare molecole in grado di bloccare questi fattori silenziandone l' RNA, come già realizzato da Kulbe nel carcinoma ovarico in vitro [99].

Il MIF mRNA iper-espresso nel 100% ( $P = .000$ ) dei casi nel tessuto tumorale endometriale rispetto a quello sano, confermano l'azione di questa citochina sulla modulazione della risposta immune anche nei confronti del tumore endometriale e la promozione dell'angiogenesi già evidenziati da diversi autori in altre neoplasie [118-122].

I macrofagi tumorali infatti sono al centro del processo di carcinogenesi, implicati attraverso il rilascio di chemochine, TNF, MMP nella progressione e metastasi; attraverso il rilascio di chemochine e VEGF nell'angiogenesi; attraverso il rilascio di chemochine, MMP e TGF $\beta$  al rimodellamento della matrice extracellulare e infine, attraverso il rilascio di fattori di crescita, TNF alla proliferazione e sopravvivenza [120]

Nella nostra serie, l' up-regolazione del MIF era direttamente proporzionale a quella dell'OPN nel 100% delle pazienti con invasione tumorale del miometrio < 50% (vedi tab. 12 e 14), mentre nelle pazienti con invasione tumorale del miometrio > 50% il rapporto era indirettamente proporzionale nel 75%, quindi ad un aumento dell'espressione del MIF corrispondeva un'inibizione dell'OPN.

Questo dato sembra in contrasto da quanto riportato per altre neoplasie e da Coppola sul carcinoma endometriale [156-157,167].

Mentre gli stessi dati sembrano in accordo con quanto riportato nello studio di Hashibuchi che dimostra una diminuzione dell'espressione immunohistochimica dell'OPN maggiore nel carcinoma sieroso rispetto a quello endometriale e rispetto all'iperplasia endometriale [168].

L'up-regolazione del MIF indirettamente proporzionale a quella del TGF $\beta$  in modo statisticamente significativo e la bassa espressione del TGF $\beta$  nel 83% dei casi di carcinoma endometriale rispetto all'endometrio normale confermano anche i dati di Perlino che riporta una riduzione dell'espressione del TGF $\beta$  nei campioni di carcinoma endometriale confrontati con endometrio normale [143].

Inoltre il fatto che bassi livelli di espressione del TGF $\beta$  siano maggiormente correlati al tessuto neoplastico rispetto all'endometrio sano, è in accordo con i dati di Rodriguez che riporta un incremento di apoptosi indotta dal progesterone e una marcata espressione di TGF $\beta$ , in queste stesse aree di apoptosi [145].

La up-regolazione del MIF correlata in modo direttamente proporzionale a quella del VEGF solo nel 58% dei casi e solo nel 50% dei casi ad alto rischio, dati i risultati dello studio di Bondza sul carcinoma endometriale che dimostrano l'iper-espressione del VEGF stimolata dal MIF, spiegherebbero perché non tutte le pazienti sono responsive alla terapia con anti-angiogenetici [125].

La conoscenza dei livelli di espressione del VEGF a livello del tumore primario e dei siti metastatici permetterebbe probabilmente di selezionare le pazienti probabilmente candidate alla terapia antiangiogenetica e di escludere a priori quelle che potrebbero essere non responsive.

In conclusione, in base ai risultati di questo studio, tutti i fattori dell'ambiente peritumorale del carcinoma endometriale esaminati hanno dimostrato livelli di espressione interessanti e meritevoli di approfondimento.

In particolare le chemochine ed i loro recettori potrebbero essere i nuovi target di terapia antitumorale per prolungare l'intervallo libero da malattia o addirittura portare alla guarigione, mediante l'utilizzo di farmaci o anticorpi bloccanti (per esempio il lornoxicam, anti-infiammatorio non steroideo, ciclossigenasi inibitore) soprattutto nei pazienti a rischio medio-alto ma con stadio del tumore ancora precoce.

Il dosaggio dei fattori di crescita, citochine e chemochine esaminati nel nostro studio, potrebbe essere utilizzato come fattore prognostico e di scelta per il tipo di terapia adiuvante, soprattutto negli stadi iniziali.

I risultati precedentemente discussi forniscono un'evidenza scientifica per individuare nuovi obiettivi per la terapia anti-tumorale in futuro anche se devono essere confermati in una popolazione più ampia e con un FU maggiore.

L'obiettivo futuro ci spinge verso la ricerca della conoscenza accurata e della manipolazione dell'interazione tessuto ospite-tumore che potrebbe essere di fondamentale importanza:

- ai fini della prognosi finale
- per prevenire la cancerogenesi, o ad invertire la trasformazione tumorale ristabilendo un normale meccanismo di controllo sul tumore
- per favorire o veicolare l'accesso di farmaci antineoplastici e immunostimolanti al tessuto tumorale
- infine per migliorare il metabolismo dei chemioterapici a livello delle cellule neoplastiche e ridurre la resistenza chemio e radio-terapica.

## 5.0 BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R. Ward E et al. (2008) Cancer statistics 2008, *Cancer J Clin* 58:71;96.
2. NCI. ERGP Hosts workshop on understudies rare cancers: <http://epi.grants.cancer.gov/Conference2/appendices.html#b> Amant F, Moerman P, Neven P, et al. Endometrial Cancer. *Lancet*. 2005;366:491-505 ASCO 2006, abstract 8632:8633
3. Ellenson LH, Wu TC. Focus on endometrial and cervical cancer. *Cancer Cell*. 2004;5:533-538
4. Southcott BM. Carcinoma of the endometrium. *Drugs*. 2001;61(10):1395-405.
5. Williams JW, Hirschowitz L. Assessment of uterine wall thickness and position of the vascular plexus in the deep myometrium: implications for the measurement of depth of myometrial invasion of endometrial carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2006;25:59-64.
6. Tsukamoto H, Shibata K, Kajima H et al. Uterine smooth muscle cells increase invasive ability of endometrial carcinoma cells through tumor-stromal interaction. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24:423-429.
7. Coussens, L. M., and Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420, 860-867.
8. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441, 431-436.
9. Mantovani, A. Cancer: Inflammation by remote control. *Nature* 2005;435, 752-753.
10. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454, 436-444.
11. Anton K, Glod J. Targeting the tumor stroma in cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2009;10:185-91
12. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:171-179.
13. Karin, M., and Greten, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5, 749-759.
14. Rossi, D., and Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18, 217-242.
15. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2006 Apr;42(6):768-78.
16. Schier AF. Chemokine signaling: rules of attraction. *Curr Biol*. 2003 Mar 4;13(5):R192-4.



17. Broxmeyer HE, Cooper S, Kohli L et al. Transgenic expression of stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 enhances myeloid progenitor cell survival/antiapoptosis in vitro in response to growth factor withdrawal and enhances myelopoiesis in vivo. *J Immunol* (Baltimore, MD: 1950) 2003; 170:421–429
18. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12:313–335.
19. Fernandez E, Lolis E (2002). "Structure, function, and inhibition of chemokines". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469–99.
20. Benelli R, Lorusso G, Albin D.M. Noonan, Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease, *Curr. Pharm. Des.* 2006;12: 3101–3115.
21. Gomperts BN, Strieter RM. Chemokine-directed metastasis, *Contrib. Microbiol.* 2006;13:170–190.
22. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis, *J. Leukoc. Biol.* 2006;79: 639–651.
23. Strieter RM, Burdick MD, Mestas B, Gomperts, M.P. Keane, J.A. Belperio, Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis, *Eur. J. Cancer* 2006;42: 768–778.
24. Ruiz de Almodovar C, Luttun A, Carmeliet, An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis, *Cell* 2006;124: 18–21.
25. Rosenkilde MM, Schwartz TW, The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease, *APMIS* 2004;112: 481–495.
26. Iivanainen E, Kahari VM, Heino J, Elenius K. Endothelial cell–matrix interactions, *Microsc. Res. Tech.* 2003;60: 13–22.
27. Genis L, Galvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG. MT1- MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25: 77–86.
28. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin. Oncol.* 2002; 29: 15–18.
29. Folkman J, Watson W, Ingber d et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, *Nature* 1989; 339: 58–61.
30. Naumov NG, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch, *Cell Cycle* 5 (2006) 1779–1787.
31. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses, *Microcirculation* 2003;10: 359–370.

32. Romagnani P, Lasagni L, F. Annunziato, M. Serio, S. Romagnani, CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis, *Trends Immunol.* 2004; 25: 201–209.
33. Strieter RM, Polverini PJ S.L. Kunkel, D.A. Arenberg, M.D. Burdick, J. Kasper, et al., The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis, *J.Biol. Chem.* 1995;270: 27348–27357.
34. Strieter RM, Polverini PJ, D.A. Arenberg, S.L. Kunkel, The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis, *Shock* 1995;4: 155–160
35. Moore BB, Arenberg DA, C.L. Addison, M.P. Keane, P.J. Polverini, R.M. Strieter, CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis, *Angiogenesis* 1998;2: 123–134.
36. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type, *Cell Cycle* 2006;5: 1597– 1601.
37. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Mar;292(3):C987-95.
38. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 Sep;50(3):274-80.
39. Heidemann J, Ogawa H, P. Rafiee, N. Lugerling, C. Maaser, W. Domschke, et al. Mucosal angiogenesis regulation by CXCR4 and its ligand CXCL12 expressed by human intestinal microvascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004;286: G1059–G1068.
40. Salcedo R, Wasserman K, H.A. Young, M.C. Grimm, O.M. Howard, M.R. Anver, et al., Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor- 1 $\alpha$ , *Am. J. Pathol.* 1999;154: 1125–1135
41. Wang J, Dai J, Y. Jung, C.L. Wei, Y. Wang, et al., A glycolytic mechanism regulating an angiogenic switch in prostate cancer, *Cancer Res.* 2007;67: 149–159.
42. Guleng B, Tateishi K, M. Ohta, F. Kanai, A. Jazag, H. Ijichi, et al., Blockade of the stromal cell-derived factor-1/ CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner, *Cancer Res.* 2005;65: 5864–5871.
43. Orimo A, Gupta PB, D.C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, et al., Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell* 2005;121: 335–348.

44. Muller A, Homey B, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, et al., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis, *Nature* 2001;410: 50–56.
45. Ruiz de Almodovar C, Luttun A, P. Carmeliet, An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis, *Cell* 2006;124: 18–21.
46. Grunewald M, Avraham I, Y. Dor, E. Bachar-Lustig, A. Itin, S. Jung, et al., VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells, *Cell* 2006;124: 175–189.
47. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokines receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006;79:639–650.
48. Scotton CJ, Wilson JL, D. Milliken, G. Stamp, F.R. Balkwill, Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res.* 2001;61: 4961–4965.
49. Phillips RJ, Burdick MD, M. Lutz, J.A. Belperio, M.P. Keane, R.M. Strieter, The stromal derived factor-1/ CXCL12–CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003;167: 1676–1686.
50. Ding Y, Shimada. M, Maeda, A. Kawabe, J. Kaganoi, I. Komoto, et al., Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 2003;9: 3406–3412.
51. Schimanski CC, Schwald S, N. Simiantonaki, C. Jayasinghe, U. Gonner, V. Wilsberg, et al., Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 2005;11: 1743–1750.
52. Schimanski CC, Bahre R, I. Gockel, A. Muller, K. Frerichs, V. Horner, et al., Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4, *Br. J. Cancer* 2006;95: 210–217.
53. Chen GS, Yu HS, C.C. Lan, K.C. Chow, T.Y. Lin, L.F. Kok, et al., CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.* 2006;154: 910–918.
54. Luker KE, Luker GD, Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer, *Cancer Lett.* 2006;238: 30–41.
55. Balabanian K, Lagane B, S. Infantino, K.Y. Chow, J. Harriague, B. Moepps, et al., The chemokine SDF-1/ CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 2005;280: 35760–35766.
56. Zlotnik, Chemokines and cancer, *Int. J. Cancer* 2006;119: 2026–2029.
57. Fernandis AZ, Prasad A, Band H et al (2004) Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 23:157–167.

58. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A et al. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(?) cells in response to chemokines. *Exp Hematol* 2000;28:1274–1285
59. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;214:231–241.
60. Murphy PM. Chemokines and molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001;345:833–835.
61. Nagasawa T, Hirota S, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, et al., Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1, *Nature* 1996) 635–638.
62. Ma Q, Jones D, P.R. Borghesani, R.A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, et al., Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:9448–9453.
63. Bleul CC, Farzan M, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, et al., The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry, *Nature* 1996;382: 829–833.
64. Oberlin E, Amara A, F. Bachelierie, C. Bessia, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, et al., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1, *Nature* 1996;382: 833–835.
65. Burns JM, Summers BC, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, et al., A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development, *J. Exp. Med.* 2006;203: 2201–2213.
66. Schioppa T, Uranchimeg B, A. Sacconi, S.K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, et al., Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia, *J. Exp. Med.* 2003;198:1391–1402.
67. Staller P, Sulitkova J, J. Lisztwan, H. Moch, E.J. Oakeley, W. Krek, Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL, *Nature* 2003;425: 307–311.
68. Hartmann TN, Burger JA, A. Glodek, N. Fujii, M. Burger, CXCR4 chemokine receptor and integrin signalling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells, *Oncogene* 2005;24: 4462–4471.
69. Mizokami Y, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Mizutani S. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -induced cell proliferation and its possible regulation by CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2004 Jul 10;110(5):652-9

70. Kodama J, Hasengaowa, Seki N, Kusumoto T, Hiramatsu Y. Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007;28(5):370-5
71. Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, Beltrami C, Pieralli A, Andersson KL, Fambrini M, Taddei GL, Serio M, Orlando C. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(3):261-8.
72. Lin Y et al. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays, *Int. J. Cancer* 2004;72: 507–515.
73. Schadendorf et al. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor, *J. Immunol.* 1993;151: 2667–2675.
74. Yao PL, Lin YC, Wang CH et al., Autocrine and paracrine regulation of interleukin-8 expression in lung cancer cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005;32: 540–547.
75. Lee LF, Louie MC, Desai SJ et al. Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: differential effects of tyrosine kinases Src and FAK, *Oncogene* 2004;23: 2197– 2205.
76. Murphy C, McGurk M, Pettigrew J et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 2005;11: 4117–4127.
77. Lu S, Dong Z. Characterization of TGF-beta-regulated interleukin-8 expression in human prostate cancer cells, *Prostate* 2006;66: 996–1004.
78. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J et al. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288: H1186–H1192.
79. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer, *Cancer Res.* 2004;64: 5535–5538.
80. Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA et al. “Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice,” *Journal of the National Cancer Institute* 1998, vol. 90, no. 6, 447–454.
81. Wang Y, Yang J, Y. Gao, et al., “Regulatory effect of e2, IL- 6 and IL-8 on the growth of epithelial ovarian cancer cells,”

Cellular & Molecular Immunology 2005, vol. 2, no. 5, pp. 365–372.

82. Pellegrino A, Antonaci F, Russo f et al. CXCR3-binding chemokines in multiple myeloma, *Cancer Lett.* 2004;207: 221–227.
83. Pellegrino A, Ria R, Di Pietro G et al. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells, *Br. J. Haematol.* 2005;129: 248–256.
84. Levina V, Nolen BM, Marrangoni MA, et al., “Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer,” *Clinical Cancer Research* 2009, vol. 15, no. 8, pp. 2647–2656
85. Vandercappellen J, Van Damme J, and Struyf S. “The role of CXC chemokines and their receptors in cancer,” *Cancer Letters*, vol. 267, no. 2, pp. 226–244, 2008.
86. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357: 539–545.
87. Sica A, Saccani A, B. Bottazzi, N. Polentarutti, et al., Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages, *J. Immunol.* 2000;164: 762–767.
88. Balkwill F, Charles KA, A. Mantovani, Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease, *Cancer Cell* 2005;7: 211–217.
89. Diez-Ruiz A, Tilz GP, Zangerle R, et al Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol.* 1995 Jan;54(1):1-8. Review
90. Manna SK, Aggarwal BB. All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells. *Oncogene.* 2000 Apr 20;19(17):2110-9.
91. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 May;9(5):361-71.
92. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor promoting network in epithelial ovarian cancer cells, *Cancer Res.* 2007;67: 585–592.
93. Madhusudan S, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, et al. Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 1;23(25):5950-9.

94. Harrison ML, Obermueller E, Maisey NR, et al. Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 10;25(29):4542-9.
95. Tabibzadeh S, Satyaswaroop PG, von Wolff M, Strowitzki T. Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal. *Mol Hum Reprod.* 1999 Dec;5(12):1141-9
96. Shaarawy M, Abdel-Aziz O. Serum tumour necrosis factor alpha levels in benign and malignant lesions of the endometrium in postmenopausal women. A preliminary study. *Acta Oncol.* 1992;31(4):417-20
97. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1997;123(3):167-72.
98. Dossus L, Becker S, Rinaldi S, et al. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , soluble TNF receptors and endometrial cancer risk: The EPIC study. *Int J Cancer.* 2010 Dec 10.
99. Kulbe H, Chakravarty P, Leinster DA, et al. and Balkwill FR. A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res.* 2012 Jan 1;72(1):66-75.
100. Smolen JS, Aletaha D. Is adalimumab in combination with methotrexate a safe and efficacious treatment for early rheumatoid arthritis? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 May;2(5):242-3
101. Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, et al, Balkwill FR. Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Sep 15;17(18):6083-96.
102. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 2008 Mar;14(3):109-19. Epub 2008 Feb 7. Review.
103. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Aug-Oct;13(4-5):357-68. Review.
104. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood.* 1989 Feb;73(2):517-26.
105. Lattanzio G, Libert C, Aquilina M, Cappelletti M, Ciliberto G, Musiani P, Poli V. Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. *Am J Pathol.* 1997 Sep;151(3):689-96.

106. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):131-44.
107. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):491-501.
108. Chung YC, Chang YF. Significance of inflammatory cytokines in the progression of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2003 Nov-Dec;50(54):1910-3.
109. Kakumu S, Shinagawa T, Ishikawa T, Yoshioka K, Wakita T, Ito Y, Takayanagi M, Ida N. Serum interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol*. 1991 Dec;86(12):1804-8.
110. Malaguarnera M, Di Fazio I, Romeo MA, Restuccia S, Laurino A, Trovato BA. J Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *Gastroenterol*. 1997 Apr;32(2):211-5.
111. Berger FG. The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Dec;88(3):281-5. Review.
112. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104: 2224–2234, 2004.
113. Murdoch C, Lewis CE. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer* 117: 701–8, 2005.
114. Van der Bij GJ, Oosterling SJ, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. The role of macrophages in tumor development. *Cell Oncol*. 2005;27(4):203-13. Review.
115. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*. 1998 Nov;4(11):707-14.
116. Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res*. 2002 Dec;8(12):3755-60.
117. Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93(4):389–96.
118. Markert JM, Fuller CM, Gillespie GY, Bubien JK, McLean LA, Hong RL, Lee K, Gullans SR, Mapstone TB, Benos DJ. Differential gene



- expression profiling in human brain tumors. *Physiol Genomics*. 2001 Feb 7;5(1):21-33
119. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2000 Jul 15;89(2):334-41.
  120. Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett*. 2009 Apr 27;123(2):97-102.
  121. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*. 1999 Mar;5(3):181-91.
  122. White ES, Flaherty KR, Carskadon S, Brant A, Iannettoni MD, Yee J, Orringer MB, Arenberg DA. Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):853-60.
  123. Denz A, Pilarsky C, Muth D, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R. Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Surg Res*. 2010 May 1;160(1):29-34. Epub 2009 May 3
  124. Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2009 Jul 14;9:230.
  125. Bondza PK, Metz CN, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates alpha(v)beta(3) integrin and vascular endothelial growth factor expression in endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa. *Journal of Reproductive Immunology* 77 (2008) 142–151
  126. Sporn MB and Roberts AB (1990) TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* 1,875–882.
  127. del Re, E., Babitt, J. L., Pirani, A., Schneyer, A. L., and Lin, H. Y. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22765–22772.
  128. Qian, S. W., Dumont, N., O'Connor-McCourt, M. D., and Burmester, J. K. (1999) *Growth Factors* 17, 63–73.
  129. Gold, L. I. The role for transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.*, 10: 303–360, 1999.
  130. Taipale, J., Saharinen, J., and Keski-Oja, J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-b: role in cancer cell growth and invasion. *Adv. Cancer Res.*, 75:87–134, 1998.
  131. Letterio, J. J., and Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 137–161, 1998.

132. Donovan, D., Harmey, J. H., Toomey, D., Osborne, D. H., Redmond, H. P., and Bouchier-Hayes, D. J. TGF- $\beta$ 1 regulation of VEGF production by breast cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.*, 4: 621–627, 1997.
133. Lee, C., Sintich, S. M., Mathews, E. P., Shah, A. H., Kundu, S. D., Perry, K. T., Cho, J. S., Ilio, K. Y., Cronauer, M. V., Janulis, L., and Sensibar, J. A. Transforming growth factor- $\beta$  in benign and malignant prostate. *Prostate*, 39: 285–290, 1999.
134. Liu VC, L.Y. Wong, T. Jang, A.H. Shah, I. Park, X. Yang, et al., Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25<sup>-</sup> T cells into CD4+CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- $\beta$ , *J. Immunol.* 178 (2007) 2883–2892.
135. Bierie B, Moses HL. Under pressure: stromal fibroblasts change their ways, *Cell* 2005;123: 985–987.
136. CH, C. Schmidhauser, M. Kobrin, M.J. Bissell, R. Derynck, Extracellular matrix regulates expression of the TGF- $\beta$  1 gene, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 253–260.
137. Sieweke MH, N.L. Thompson, M.B. Sporn, M.J. Bissell, Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF- $\beta$ , *Science* 248 (1990) 1656–1660.
138. Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. TGF- $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103: 295–309, 2000.
139. Alexandrow, M. G., and Moses, H. L. Kips off to Myc: implications for TGF- $\beta$  signaling. *J. Cell. Biochem.* 1997;66: 427–432.
140. Tabibzadeh S. Human endometrium: an active site of cytokine production and action. *Endocrinol Rev* 1991; 12: 272-290.
141. Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproduction medicine. *Fertil Steril* 1994;61: 1-17.
142. Gurpide E. Endometrial cancer: biochemical and clinical correlates. *J Natl Cancer Inst* 1991;83: 405-416.
143. Perlino E, Loverro G, Maiorano E, Giannini T, Cazzolla A, Napoli A, Fiore MG, Ricco R, Marra E and Selvaggi L. Down regulated expression of transforming growth factor beta I mRNA in endometrial carcinoma. *British Journal of Cancer* 1998; 77(8): 1260-1266.
144. Trilok V. Parekh, Patricia Gama, Xie Wen, Rita Demopoulos, John S. Munger, Maria-Luisa Carcangiu, Michael Reiss, and Leslie I. Gold. Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Is Disabled Early in Human Endometrial Carcinogenesis Concomitant with Loss of Growth Inhibition. *Cancer Research* 62, 2778–2790, May 15, 2002

145. Rodriguez GC, et al. Progestin Treatment Induces Apoptosis and Modulates Transforming Growth Factor-B in the Uterine Endometrium Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17(3).
146. Mishina Y, Whitworth DJ, Racine C, Behringer RR. High specificity of Müllerian-inhibiting substance signaling in vivo.Endocrinology. 1999 May;140(5):2084-8
147. Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF Jr, Shah PC, Kehas DJ, Kenneally MK, Dombkowski DM, Ha TU, Preffer FI, Donahoe PK. Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS.Clin Cancer Res. 1999 Nov;5(11):3488-99.
148. AE, Pearsall LA, Christian BP, Donahoe PK, Vacanti JP, MacLaughlin DT. Highly purified müllerian inhibiting substance inhibits human ovarian cancer in vivo. Clin Cancer Res. 2002 Aug;8(8):2640-6.
149. Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK. Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. Proc Natl Acad Sci US A 2005;3:111 – 6.
150. Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E.Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. J Biol Chem. 2007 Feb 16;282(7):4794-802.
151. Chambers, A. F., Wilson, S. M., Kerkvliet, N., O'Malley, F. P., Harris, J. F., and Casson, A. G. Osteopontin expression in lung cancers. Lung Cancer 1996, 15: 311–323
152. Thalmann, G. N., Sikes, R. A., Devoll, R. E., Kiefer, J. A., Markwalder, R., Klima, I., et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. Clin. Cancer Res 1999, 5: 2271–2277.
153. Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A. F., Szabo, M., Coppola, D., and Yeatman, T. J. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 2002, 94: 513–521.
154. Tuck, A. B., and Chambers, A. F. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia 2001,6: 419–429.
155. Furger, K. A., Menon, R. K., Tuck, A. B., Bramwell, V. H., and Chambers, A. F. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. Curr. Mol. Med 2001, 1: 621–632.
156. Senger DR, Asch BB, Smith BD, Perruzzi CA, Dvorak HF. A secreted phosphoprotein marker for neoplastic transformation of both epithelial and fibroblastic cells. Nature 1983;302:714-15.

157. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* 1989;9:1291-1300
158. Craig, A. M., Bowden, G. T., Chambers, A. F., Spearman, M. A., Greenberg, A. H., Wright, J. A., McLeod, M., and Denhardt, D. T. Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multi-stage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts. *Int. J. Cancer* 1990, 46: 133–137.
159. Chambers, A. F., Behrend, E. I., Wilson, S. M., and Denhardt, D. T. Induction of expression of osteopontin (OPN; secreted phosphoprotein) in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Anticancer Res* 1992, 12: 43–48.
160. Bautista, D. S., Saad, Z., Chambers, A. F., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P., Singhal, H., Tokmakejian, S., Bramwell, V., and Harris, J. F. Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin. Biochem* 1996, 29: 231–239.
161. Patarca, R., Saavedra, R. A., and Cantor, H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol* 1993, 13: 225–246.
162. Shijubo, N., Uede, T., Kon, S., Nagata, M., and Abe, S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology. *Crit. Rev. Oncog* 2000, 11: 135–146.
163. Singhal, H., Bautista, D. S., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P., Tuck, A. B., Chambers, A. F., and Harris, J. F. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin. Cancer Res* 1997, 3: 605–611.
164. Fedarko, N. S., Jain, A., Karadag, A., Van Eman, M. R., and Fisher, L. W. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin. Cancer Res* 2001, 7: 4060–4066.
165. Hotte, S. J., Winquist, E. W., Stitt, L., Wilson, S. M., and Chambers, A. F. Plasma osteopontin: associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer (Phila.)* 2002, 95: 506–512.
166. Kim, J. H., Skates, S. J., Uede, T., Wong, K. k. K. K., Schorge, J. O., Feltmate, C. M., Berkowitz, R. S., Cramer, D. W., and Mok, S. C. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *J. Am. Med. Assoc* 2002, 287: 1671–1679.
167. Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies *Clin Cancer Res* 2004;10:184-190.

168. Hashibuchi Y, Tsuda H, Bandera CA, Nishimura S, Inoue T, Kawamura N, Berkowitz RS, Mok SC. Comparison of osteopontin expression in endometrioid endometrial cancer and ovarian endometrioid cancer. *Med Oncol* 2006; 23:205-212.
169. Tiniakos DG, Yu H, Liapis H. Osteopontin expression in ovarian carcinomas and tumors of low malignant potential (LMP). *Hum Pathol*. 1998 Nov;29(11):1250-4.
170. Zhang L, Shao S and Wu Ya. The expression and significance of osteopontin and B7H4 in epithelial ovarian neoplasm. *Chinese Journal of Cancer* 2010, Vol.29 Issue 1;24-28.
171. Kim JH, Skates SJ et al Osteopontin as a Potential Diagnostic Biomarker for Ovarian Cancer. *JAMA*. 2002;287:1671-1679.
172. Duhoux FP and Machiels JP. "Antivascular therapy for epithelial ovarian cancer," *Journal of Oncology* 2010;2010,Article ID 372547: 9.
173. Kassim SK, El-Salahy EM, S. T. Fayed et al., "Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients," *Clinical Biochemistry* 2004;37(5):363-369.
174. Paley PJ, Staskus KA, K. Gebhard et al., "Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma," *Cancer* 1997; 80: 98-106.
175. Zhang A, Meng L, Q. Wang et al., "Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2," *Oncology Reports* 2006;15: 831-836.
176. Byrne AT, Ross L, J. Holash et al., "Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model," *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 5721-5728.
177. Shen GH, Ghazizadeh M, O. Kawanami et al., "Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma," *The British Journal of Cancer* 2000;83:196-203.
178. Hefler LA, Mustea A, D. K"onsgen et al., "Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer," *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 898-901.
179. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain R and Alitalo K (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276,1423-1425.
180. Skobe M, Hawighorst T, Jackson D, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K and Detmar M (2001) Induction of

- tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7,192–198.
181. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings J, Holland C, Emoto M, Umemoto M, Sakomoto T, Sato S et al. (2003) Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 27,237–244.
  182. Koukourakis MI, Limberis V, Tentes I et al. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/KDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine*. 2011 Mar;53(3):370-5
  183. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kowalczyk O et al. Serum levels of VEGF and VEGF-C in patients with endometrial cancer. *Eur Cytokine Netw*. 2011 Mar;22(1):45-51
  184. Chen CA, Cheng WF, Lee CN, Wei LH, Chu JS, Hsieh FJ, et al. Cytosol vascular endothelial growth factor in endometrial carcinoma: correlation with disease-free survival. *Gynecol Oncol* 2001; 80: 207-12.
  185. Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, Kobayashi H, Sakai K, Tsuruchi N, et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 741-7.
  186. Obermair A, Tempfer C, Wasicky R, Kaider A, Hefler L, Kainz C. Prognostic significance of tumor angiogenesis in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 367-71.
  187. Pengchong H, Tao H. Expression of IGF-1R, VEGF-C and D2-40 and their correlation with lymph node metastasis in endometrial adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(6):660-4.
  188. Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, et al. Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2272-7.
  189. Forssell J et al. *Clin. Cancer Res* 2007;13, 1472–1479.
  190. Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, et al. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11:1897–1902.