

ONCOLOGIA

Il cancro è un disordine genetico causato da mutazioni del DNA che sono acquisite spontaneamente o indotte da insulti ambientali. Questi cambiamenti genetici ed epigenetici alterano l'espressione o la funzione di geni chiave che regolano processi fondamentali delle cellule, come crescita, sopravvivenza e invecchiamento.

Queste alterazioni genetiche sono ereditarie, essendo trasferite alle cellule figlie con la divisione cellulare. Di conseguenza le cellule che recano queste alterazioni sono soggette a selezione darwiniana. Le cellule che presentano mutazioni che conferiscono loro vantaggi per la sopravvivenza e la crescita, sopraffano quelle vicine e costituiscono pertanto la popolazione dominante.

La selezione darwiniana ha anche un ruolo nella progressione e nelle recidive delle neoplasie.

L'accumularsi di mutazioni determina la comparsa di una serie di proprietà che sono state indicate come caratteri distintivi del cancro:

- Autosufficienza dei segnali di crescita, per cui la crescita dei tumori diventa autonoma
- Mancata risposta dei segnali inibitori della crescita
- Elusione della morte cellulare, che consente alle cellule cancerose di sopravvivere in condizioni capaci di indurre l'apoptosi delle cellule normali.
- Potenziale replicativo illimitato
- Sviluppo dell'angiogenesi per sostenere la crescita delle cellule tumorali
- Capacità di invadere localmente i tessuti e di diffondere in sedi a distanza
- Riprogrammazione delle vie metaboliche
- Capacità di eludere il sistema immunitario

Il termine "*neoplasie*" significa *nuova crescita*. Le cellule neoplastiche vengono dette *trasformate* in quanto continuano a replicarsi. Le neoplasie, pertanto, acquisiscono un certo grado di autonomia e tendono a proliferare indipendentemente dalla condizione ambientale. Tutte le neoplasie dipendono dall'ospite per i nutrienti e la vascolarizzazione.

Nella maggior parte dei tessuti che si rigenerano, le cellule mature sono le cellule differenziate terminali e hanno una vita di breve durata. Quando le cellule mature muoiono, il tessuto è rimpiazzato dalla differenziazione di nuovi elementi generati da cellule staminali. Pertanto in questi tessuti vi è un equilibrio omeostatico tra replicazione, autorinnovamento e differenziazione delle cellule staminali e morte delle cellule mature pienamente differenziate. Queste relazioni sono particolarmente evidenti negli epiteli in continua replicazione dell'epidermide e del tratto gastrointestinale, in cui le cellule staminali vivono nello strato basale dell'epitelio e le cellule si differenziano a mentre migrano verso gli strati più superficiali dell'epitelio prima di morire e desquamare dalla superficie.

Le cellule staminali sono caratterizzate da due importanti proprietà: capacità di auto rinnovamento e replicazione asimmetrica. *Replicazione asimmetrica* significa che quando una cellula staminale si divide, una cellula figlia inizia il percorso di differenziazione che porta la formazione di cellule mature, mentre l'altra resta una cellula staminale indifferenziata che conserva la capacità di auto rinnovamento. L'auto

rinnovamento per mettere le cellule staminali di mantenere una popolazione funzionale di precursori per lunghi periodi di tempo. Esistono fondamentalmente due tipi di cellule staminali:

- La cellula è **staminali embrionali (ES)** sono le cellule staminali più indifferenziate; sono presenti nella massa cellulare interna della blastocisti e hanno grande capacità di rinnovamento cellulare. Di conseguenza possono essere mantenuti in coltura per oltre un anno senza che si differenzino.
- Le cellule staminali adulte, chiamate anche **cellule staminali tissutali**, sono meno indifferenziate delle cellule ES e si trovano tra le cellule differenziate all'interno di un organo di un tessuto. Sebbene anche l'esame le staminali tissutali abbiano capacità di auto rinnovamento, questa capacità è molto più limitata. Inoltre il loro potenziale di differenziazione è ristretto solo ad alcune o tutte le cellule differenziate del tessuto dell'organo nel quale sono localizzate.

Mentre la normale funzione delle cellule ES è di dare origine alle cellule di tutto il corpo, le cellule staminali tissutali sono coinvolte nell'omeostasi dei tessuti. Le cellule staminali tissutali sono molto difficili e rare da isolare. Inoltre, esse si ritrovano in specializzati micro ambienti all'interno dell'organo chiamate nicchia delle cellule staminali. Apparentemente, segnali provenienti da altre cellule in tali nicchie mantengono quiescenti e indifferenziata le cellule staminali.

Nel comune linguaggio medico, le neoplasie si definiscono *tumori*, e in base al comportamento clinico i tumori vengono classificati i benigni e maligni.

Un tumore è detto *benigno* quando le sue caratteristiche micro e macroscopiche appaiono relativamente innocue, ovvero il tumore rimane localizzato e può essere rimosso chirurgicamente.

Un tumore è detto *maligno* è comunemente chiamato cancro, dalla parola latina "granchio" a indicare che esso aderisce a pastina talmente in qualunque sede si estenda. Il termine maligno è riferito a una neoplasia e implica che la lesione può invadere e distruggere le strutture adiacenti e diffondere in sede a distanza (metastatizzare) fino a causare il decesso.

Tutti i tumori, benigni e maligni, hanno due componenti di base: il **parenchima**, formato da cellule trasformate o neoplastiche, e lo **stroma** non neoplastico di supporto, derivare dall'ospite, formato da tessuto connettivo, vasi sanguigni e cellule infiammatorie dell'ospite. Il parenchima della neoplasia condiziona ampiamente il suo comportamento biologico ed è da questa componente che il tumore deriva la propria denominazione. Lo stroma è fondamentale per la crescita della neoplasia, in quanto fornisce l'apporto ematico e il supporto della crescita delle cellule del parenchima.

In generale, i tumori benigni sono designati aggiungendo un suffisso *-oma* al tipo cellulare da cui il tumore si origina.

Le neoplasie maligne che si originano da tessuti mesenchimali solidi o da essi derivati sono dette *sarcomi* mentre quelle che si originano dalle cellule mesenchimali del sangue sono dette leucemie o linfomi. I sarcomi sono definiti in base al tipo di cellule da cui sono composti, che presumibilmente dipende dal tipo cellulare da cui si originano. Pertanto, un tumore maligno che origina dal tessuto fibroso è un fibrosarcoma, mentre una neoplasia maligna composta da condrociti è un condrosarcoma.

Gli epitelii del corpo umano sono derivati dei tre foglietti cellulari germinativi, le neoplasie maligne che originano da cellule epiteliali sono definite *carcinomi* indipendentemente dal tessuto di origine. I carcinomi

sono suddivisi ulteriormente. I carcinomi che si sviluppano con aspetto ghiandolare sono detti adenocarcinomi, quelli che producono cellule squamose sono chiamati carcinomi squamocellulari. Le cellule trasformate di una neoplasia, benigne o maligne, spesso si somigliano tra loro, come se tutte derivassero da un unico tumore, in accordo con l'origine monoclonale dei tumori.

Vi sono quattro caratteri distintivi in base ai quali si possono distinguere i tumori benigni e maligni: differenziazione e anaplasia, tasso di crescita, invasività locale e metastasi.

Differenziazione e anaplasia sono caratteristiche osservate solo nelle cellule parenchimali che costituiscono gli elementi trasformati in neoplasie. La differenziazione delle cellule parenchimali del tumore consiste nel loro grado di somiglianza con le loro controparti normali dal punto di vista morfologico e funzionale.

- le neoplasie benigne sono composte da cellule ben differenziate che assomigliano notevolmente alla loro controparte normale.
- Le neoplasie maligne sono caratterizzate da un'ampia varietà nella differenziazione delle cellule parenchimali, da quelle ben differenziate a quelle completamente indifferenziate.
- le neoplasie maligne formate da cellule indifferenziate sono dette anaplastiche. La mancanza di differenziazione, o *anaplasia*, è considerata un aspetto fondamentale della malignità. Il termine anaplasia significa letteralmente regressione, il che implica differenziazione o perdita della differenziazione strutturale e funzionale delle cellule normali.

Le cellule anaplastiche presentano un notevole pleomorfismo (cioè variabilità di forma e dimensione). Spesso i nuclei sono estremamente ipercromici (colorazione scura) e di grandi dimensioni, tali da determinare un aumento del rapporto nucleo/citoplasmatico. Si possono formare cellule giganti che appaiono notevolmente più grandi rispetto a quelle vicine e possono presentare un nucleo enorme o molti nuclei. I nuclei anaplastici sono variabili e bizzarri per forme e dimensioni. Più differenziata è la cellula tumorale, più essa mantiene inalterate le capacità funzionali della sua controparte normale.

Tasso di crescita. La maggior parte dei tumori benigni cresce lentamente, mentre la maggior parte dei tumori maligni cresce con maggiore rapidità, eventualmente diffondendosi localmente in sede a distanza, fino a causare il decesso. Il tasso di crescita dei tumori maligni di solito è inversamente correlato al loro livello di differenziazione. In altri termini, i tumori scarsamente differenziati tendono a crescere più rapidamente dei tumori ben differenziati

La crescita costante il mantenimento di molti tessuti che contengono cellule a vita breve, come le cellule ematiche e le cellule epiteliali del tratto digerente della cute, richiedono una popolazione residente di cellule staminali tissutali che vivono a lungo e siano in grado di auto rinnovarsi. Le cellule staminali dei tessuti sono quantitativamente limitate e si ritrovano in una nicchia creata da cellule di supporto che producono fattori paracrini per il sostentamento delle cellule staminali stesse.

Le cellule staminali si dividono in modo asimmetrico per produrre due tipi di cellule figlie: quelle con potenziale proliferativo limitato, che vanno incontro a differenziazione terminale per formare determinati tessuti, è quella che mantengono il potenziale staminale. I cancri sono immortali e hanno capacità

proliferativa illimitata; ciò significa che, come tessuti normali, anche se devono contenere cellule con proprietà tipo-staminale.

Il concetto di cellula staminale neoplastica a molte implicazioni importanti. Se le cellule staminali neoplastiche sono essenziali per la sopravvivenza del tumore, ne consegue che queste cellule devono essere eliminate per curare i pazienti affetti. Si

Le cellule staminali neoplastiche potrebbero originare dalle cellule staminali dei tessuti normali o da cellule più differenziate che, nel processo di trasformazione, acquisiscono proprietà di auto rinnovamento. ipotizza che, come per le cellule staminali normali, le cellule staminali neoplastiche siano resistenti alle terapie convenzionali a causa del loro basso tasso di divisione cellulare e l'espressione di fattori che contrastano gli effetti dei farmaci chemioterapici.

Le cellule staminali neoplastiche potrebbero originare dalle cellule staminali dei tessuti normali o da cellule più differenziate che, nel processo di trasformazione, acquisiscono la proprietà di auto rinnovamento.

Invasione locale. Una neoplasia benigna rimane localizzata nella sua sede di origine. Essa non ha la capacità di infiltrare, invadere o metastatizzare in sede a distanza come fanno le neoplasie maligne. Ad esempio, gli adenomi sviluppano una capsula fibrosa delimitante che li separa dal tessuto dell'ospite. Questa capsula, probabilmente, deriva dallo stroma del tessuto dell'ospite in quanto le cellule parenchimali atrofizzano sotto la pressione del tumore in espansione. Lo stroma del tumore può a sua volta contribuire alla formazione della capsula. Pochi tumori benigni sono privi di capsula e non ben circoscritti.

I tumori maligni si accrescono in filtrando, invadendo, distruggendo e penetrando progressivamente nei tessuti circostanti. Essi non presentano capsule ben definite. La crescita di tipo infiltrante comporta la necessità di rimuovere un ampio margine di tessuto normale circostante quando si tenta la rimozione chirurgica di una neoplasia maligna. Insieme alla capacità di metastatizzare, l'invasività locale rappresenta la caratteristica più affidabile per la distinzione tra tumori maligni e Benigni.

Metastasi. Le metastasi sono impianti secondari del tumore che appaiono distaccati dal tumore primitivo e localizzati a distanza. La capacità di metastatizzare identifica una neoplasia come maligna più di ogni altra caratteristica. Non tutti i tumori maligni hanno la stessa capacità di dare metastasi. A un estremo vi sono i carcinomi basocellulari della cute e la maggior parte dei tumori primitivi del sistema nervoso centrale, che sono altamente invasivi localmente ma metastatizzano di rado. All'altro estremo vi sono i sarcomi osteogeni, che di solito rappresentano metastasi i polmoni e al timo al momento della loro identificazione.

La disseminazione pregiudica fortemente e può precludere la radicazione della malattia. Le neoplasie maligne si disseminano attraverso una delle seguenti tre modalità: disseminazione all'interno di cavità corporee, diffusione per via linfatica, diffusione per via ematica.

La *diffusione per disseminazione* si verifica quando le neoplasie invadono una cavità corporea esistente. Questa modalità di disseminazione è particolarmente caratteristica dei tumori maligni ovarici che spesso ricoprono ampiamente le superfici peritoneali.

La *diffusione per via linfatica* è più tipica dei carcinomi, mentre la diffusione per via ematica è più comune nei sarcomi. Le modalità di interessamento dei linfonodi dipendono principalmente dalla sede della neoplasia primitiva e dalle caratteristiche esistenti nel locale drenaggio linfatico. I carcinomi del polmone

che originano in corrispondenza delle vie aeree distali, metastatizzano dapprima a livello dei linfonodi bronchiali e poi dei linfonodi tracheobronchiali.

Il carcinoma della mammella in genere origina nel quadrante superiore esterno e diffonde inizialmente a livello dei linfonodi ascellari.

In alcune circostanze le cellule neoplastiche sembrano oltrepassare i vasi linfatici all'interno dei linfonodi immediatamente prossimali per rimanere intrappolati nei linfonodi successivi, dando luogo a una metastasi a salto. Le cellule possono attraversare tutti linfonodi fino a raggiungere il comparto vascolare attraverso il dotto toracico. Un "linfonodo sentinella" è il primo linfonodo regionale che riceve il flusso linfatico del tumore primitivo. La biopsia dei linfonodi sentinella consente di determinare l'entità della diffusione del tumore e può essere utilizzata per pianificare il trattamento.

I prodotti di necrosi della neoplasia e gli antigeni tumorali spesso provocano risposte immunologiche nei linfonodi, come iperplasia dei follicoli e proliferazione di macrofagi nei seni sottocapsulari.

La *diffusione per via ematica* rappresenta la modalità di diffusione più comune dei sarcomi. Le arterie sono attraversate meno facilmente rispetto alle vene. In seguito all'invasione venosa, le cellule trasportate dal sangue seguono il flusso non venoso di drenaggio della sede della neoplasia, con arresto delle cellule tumorali spesso in corrispondenza del primo letto capillare incontrato. Siccome l'intera area di drenaggio della vena porta affluisce al fegato e il sangue che attraversa la vena cava affluisce ai polmoni, fegato e polmoni sono le sedi secondarie più frequentemente interessate hanno la diffusione per via ematica. Alcuni carcinomi hanno la tendenza ad accrescersi all'interno delle vene.

CANCEROGENESI: BASI MOLECOLARI

- Un danno genetico non letale rappresenta l'aspetto fondamentale della cancerogenesi. questa mutazione può essere acquisita in seguito all'azione di fattori ambientali, come agenti chimici, radiazioni o virus, oppure può essere ereditata attraverso le cellule germinali. L'ipotesi genetica del cancro implica che la massa tumorale dipende dall'espansione clonale di un'unica cellula progenitrice che ha subito un danno genetico.
- I geni in cui sono localizzate le alterazioni responsabili del fenotipo tumorale sono denominati geni tumore-associati e possono essere raggruppati in quattro distinte classi funzionali:
 - Gli **oncogeni** sono geni che determinano la comparsa di un fenotipo trasformato, quando espressi nella cellula. La maggior parte degli oncogeni è rappresentata da versioni mutate e superspresse di geni normalmente presenti nelle cellule, i cosiddetti *proto-oncogeni*. Molti oncogeni codificano per i fattori di trascrizione, proteine regolatrici della crescita o proteine implicate nella sopravvivenza cellulare e nelle interazioni cellula-cellula o cellula-matrice. Essi sono considerati dominanti in quanto la mutazione di un singolo allele può determinare la trasformazione cellulare.
 - I geni **onco-soppressori** sono geni che di norma prevencono la crescita incontrollata e, quando mutati o persi da una cellula, consentono al fenotipo trasformato di svilupparsi. In genere devono essere danneggiati entrambi gli alleli normali di un gene è un compressore perché si abbia la trasformazione. La loro funzione viene persa nella cellula tumorale.
 - I geni onco-soppressori, di solito vengono suddivisi in due gruppi, "regolatori" e "guardiani". I geni **regolatori**, come RB, sono classici geni compressori la cui mutazione comporta la trasformazione

per rimozione di un importante freno alla proliferazione cellulare. I geni **guardiani** sono responsabili del rilevamento del danno al genoma. Alcuni di questi geni iniziano e organizzano una complessa risposta per il controllo del danno.

- I geni che regolano la apoptosi e la riparazione del DNA possono comportarsi come protooncogeni o come onco-soppressori.

Ciclo cellulare normale

La proliferazione cellulare è un processo strettamente controllato che coinvolge un gran numero di molecole e di vie intercorrelate. La replicazione è stimolata da fattori di crescita o da segnali provenienti da componenti della MEC tramite le integrine.

Per ottenere la replicazione del DNA e la divisione, la cellula attraversa una sequenza di eventi strettamente controllata, nota come ciclo cellulare. Il ciclo cellulare consiste delle fasi G1 (pre sintetica), S (sintesi del DNA), G2 (premitotica), M (mitotica).

Ciascuna fase del ciclo cellulare dipende dall'attivazione appropriata e dal completamento delle precedenti e il ciclo si ferma in un punto in cui una funzione genetica essenziale risulta essere deficitaria.

Il ciclo cellulare ha molti punti di controllo, specie durante il passaggio da G0 a G1 e quello da G1 alla fase S. Le cellule possono entrare in G1 sia da G0 sia dopo il completamento della mitosi. Le cellule in G1 progrediscono attraverso il ciclo cellulare e raggiungono uno stadio critico al momento della transizione G1-S, noto come punto di restrizione.

La progressione lungo il ciclo cellulare, specie per la transizione G1-S, è regolata da proteine dette *cicline*, chiamate così a causa della loro natura ciclica della loro produzione e della loro degradazione, e da enzimi associati, le CDK. Queste acquisiscono l'attività catalitica legandosi alle cicline e formando con queste dei complessi.

I complessi CDK-ciclina fosforilano proteine bersaglio cruciali che guidano la cellula lungo il ciclo cellulare. Sono state identificate più di quindici cicline; le cicline D, E, A e B appaiono in modo sequenziale durante il ciclo cellulare e legano una o più CDK. Ciascuna tappa del ciclo cellulare è regolata da un gruppo diverso di cicline: dove si ferma un gruppo di cicline, interviene il successivo.

La ciclina D-CDK6 e ciclina E-CDK2 regolano la transizione G1-S. Ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDK1 sono attive nella fase S. Ciclina B-CDK1 è essenziale per la transizione G2-M.

L'attività dei complessi CDK-ciclina è regolata da inibitori delle CDK (CKI), che potenziano i punti di controllo del ciclo. Nell'ambito del ciclo cellulare vi sono meccanismi di controllo preposti al rilevamento dei danni al DNA e ai cromosomi. Questi sistemi di controllo di qualità sono detti checkpoint; essi assicurano che le cellule con danni al DNA o ai cromosomi non completino la replicazione. Il checkpoint G1-S monitora l'integrità del DNA prima della sua replicazione, mentre il checkpoint G2-M controlla il DNA dopo la replicazione e verifica se la cellula può iniziare con sicurezza la mitosi.

Un meccanismo relativamente comune in cui le cellule neoplastiche acquisiscono l'autonomia nella crescita è rappresentata da una mutazione a carico di geni che codificano per vari componenti della via di traduzione del segnale che origina dai recettori per i fattori di crescita. Queste proteine di trasduzione del segnale collegano i recettori per i fattori di crescita con i loro bersagli nucleari. Esse ricevono i segnali dei recettori attivati dai fattori di crescita e le trasmettono al nucleo, sia mediante secondi messaggeri sia tramite una cascata di fosforilazione e attivazione di molecole che traducono il segnale. Due membri importanti di questa categoria sono RAS e ABL.

La proteina RAS è un protooncogene e più comunemente mutato nei tumori umani. RAS è un membro della famiglia delle proteine G che legano i nucleotidi guanosinici (GTP e GDP).

Le proteine RAS normali passano alternativamente da uno stato attivato per la trasmissione del segnale a uno stato quiescente. Esse sono inattive quando legano il GDP; la stimolazione della cellula da parte di fattori di crescita comporta il passaggio da GDP a GTP e conseguenti cambiamenti conformazionali che inducono l'attivazione di RAS.

La proteina RAS attivata stimola regolatori della proliferazione situati a valle tramite due diverse vie che convergono sul nucleo e che portano segnali per la proliferazione cellulare: la cosiddetta via della RAF/ERK/MAP chinasi e la via della PI3 chinasi/AKT.

Le mutazioni che deregolano l'attività di cicline e CDK possono favorire la proliferazione cellulare. Infatti, tutti i tumori presentano lesioni genetiche che disattivano il checkpoint G1-S, determinando il rientro continuo delle cellule in fase S.

Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita

Mentre gli oncogeni codificano per proteine che promuovono la crescita cellulare, i prodotti dei geni oncosoppressori esercitano un freno sulla proliferazione cellulare. La distruzione di questi geni rende le cellule refrattarie all'inibizione della crescita e simula gli effetti promuoventi della crescita degli oncogeni.

Il gene del *retinoblastoma* (**RB**) fu il primo oncosoppressore ad essere scoperto e ha un ruolo cruciale nel ciclo cellulare nel passaggio G1/S.

L'inizio della replicazione del DNA (fase S) richiede l'attivazione dei complessi ciclina E/CDK2, e l'espressione di ciclina E dipende dalla famiglia dei fattori di trascrizione E2F. All'inizio della fase G1, Rb si trova nella sua forma attiva ipofosforilata e si lega ai fattori di trascrizione della famiglia E2F, prevenendo la trascrizione della ciclina E.

Rb ipofosforilata blocca la trascrizione E2F mediata con almeno due modalità. Nella prima, essa sequestra E2F, impedendone l'interazione con altri fattori di trascrizione. Nella seconda, Rb recluta proteine che modellano la cromatina, come istoni deacetilasi e istoni metiltransferasi. Queste si legano ai promotori dei geni E2F responsivi come la ciclina E. Tali enzimi modificano la cromatina in corrispondenza dei promotori per rendere la DNA insensibile ai fattori di trascrizione.

La situazione cambia in presenza di segnali mitogeni. Il segnale ha portato dal fattore di crescita comporta l'espressione della ciclina D e l'attivazione dei complessi ciclina D-CDK-4/6. Questi complessi fosforilano Rb, inattivando la proteina e consentendo a E2F di indurre l'espressione dei geni target come la ciclina E. Quindi l'espressione di ciclina E stimola la replicazione del DNA e la progressione attraverso il ciclo cellulare.

Quando le cellule entrano in fase S, sono commissionate a dividersi senza che siano necessari stimoli da parte di altri fattori di crescita. Durante la conseguente fase M., i gruppi fosfato vengono rimossi da Rb, rigenerando la forma ipofosforilata di Rb.

E2F Non è l'unico target di Rb. RB è una proteina versatile, che si lega a una varietà di altri fattori di trascrizione che regolano la differenziazione cellulare. Pertanto, la via mediata da Rb associa il controllo della progressione del ciclo cellulare in G0-G1, alla differenziazione, e ciò può spiegare il motivo per cui la differenziazione si associa all'uscita dal ciclo cellulare.

Tuttavia il gene Rb non è mutato in tutti i tumori. Infatti, mutazioni a carico di altri geni che controllano la fosforilazione di Rb possono simulare l'effetto della perdita di RB; questi geni sono mutati in molti tumori che sembrano avere il gene Rb normale. Ad esempio, l'attivazione mutazionale di CDK4 o la super espressione della ciclina D, favorisce la proliferazione cellulare facilitando la fosforilazione e l'inattivazione di Rb. Infatti, la ciclina D è super espressa in molti tumori in seguito ad amplificazione o traslocazione del gene. L'inattivazione mutazionale dei CDK e guiderebbe a sua volta il ciclo cellulare mediante la mancata attivazione delle cicline e delle CDK.

Il gene che codifica per l'oncosoppressore **p53**, TP53, è uno dei geni più frequentemente mutati nei tumori dell'uomo. La proteina p53 contrasta la trasformazione neoplastica attraverso tre meccanismi interconnessi: induzione di un arresto temporaneo del ciclo cellulare (denominato **quiescenza**), induzione di un arresto permanente del ciclo cellulare (denominato **senescenza**) e attivazione della morte cellulare programmata (**apoptosi**).

Un'ampia varietà di stress stimola la risposta delle mediate da p53, tra cui anossia, attività inappropriata di oncoproteine e danno dell'integrità del DNA. Nelle cellule sane, p53 ha una breve emivita (20 minuti) a causa della sua associazione con MDM2, una proteina che interagisce con p53 per la sua distruzione. Quando la cellula è sottoposta a una condizione di stress sono attivati sensori tra cui proteine chinasi come ATM. Questi complessi attivati catalizzano modificazioni post-trascrizionali di p53 che ne aumentano il rilascio dal legame con MDM2 e l'aumento della sua emivita e dalla sua capacità di indurre trascrizione dei geni target. Sono state evidenziate centinaia di geni la cui trascrizione è indotta da p53. Questi geni impediscono la trasformazione neoplastica attraverso tre meccanismi:

- L'**arresto del ciclo cellulare** mediato da p53 può essere considerato una risposta primordiale al danno del DNA. Esso si verifica tardi in fase G1 ed è causato principalmente dalla trascrizione p53 dipendente dal gene per un CDKI (p21). La proteina p21 inibisce i complessi ciclina-CDK e previene la fosforilazione di Rb, restando così la cellula in fase G1.

La proteina p53 determina anche l'espressione di geni per la riparazione del DNA. Se il danno al DNA è riparato con successo, p53 regola positivamente la trascrizione di MDM2, con conseguente distruzione di p53 e sblocco del ciclo cellulare. Se il danno non può essere riparato, la cellula può entrare in stato di senescenza indotta da p53 può andare incontro ad apoptosi diretta da p53.

- La **senescenza** indotta da p53 è un arresto permanente del ciclo cellulare caratterizzata da cambiamenti specifici nella morfologia e nella espressione dei geni che la differenziano dalla presenza o dall'arresto reversibile del ciclo cellulare. La senescenza richiede l'attivazione di p53 e di Rb è l'espressione dei loro mediatori, come CDKI. I meccanismi della senescenza sembra che

implichino cambiamenti globali a livello della cromatina, che alterano drasticamente e in modo permanente l'espressione genica.

- **L'apoptosi** indotta da p53 dalle cellule con danni irreversibili al DNA e il meccanismo di protezione finale nei confronti della trasformazione neoplastica. Essa è mediata da molti geni pro-apoptotici, come BAX e PUMA.

MECCANISMO DI ATTIVAZIONE DI p53	Conseguenze dell'attivazione	tumori
Mutazione della sequenza DBD	P53 a non riconoscere appropriate sequenze di DNA e non attiva la corrispondente trascrizione	Colon, mammella, polmone, SNC, pancreas, stomaco, esofago, altri
Delezione del dominio carbossi-terminale	Mancata formazione dei tetrameri di p53	Tumori di varie sedi
Amplificazione di MDM2	Aumentata stimolazione della degradazione di p53	Sarcomi, SNC
Infezione virale	Proteine virali si legano a p53, inattivandola o favorendone la degradazione	Cervice uterina, fegato, linfomi
Delezione di p14	Incapacità di inibire MDM2 e quindi di avviare la risposta p53	Mammella, SNC, polmone
Delocalizzazione di p53 nel citoplasma	Mancanza della funzione di p53	Mammella, neuroblastoma

Inibizione da contatto

Quando le cellule normali crescono in coltura, esse proliferano fino a formare strati mononucleati confluenti; il contatto cellula-cellula che si forma nello strato monocellulare impedisce l'ulteriore proliferazione cellulare.

L'inibizione da contatto è abolita nelle cellule tumorali, consentendo loro di ampliarsi l'una sull'altra. I contatti cellula-cellula sono mediati in molti tessuti da interazioni omodimeriche tra proteine transmembrana chiamate *caderine*. L'E-caderina media il contatto cellula-cellula negli strati dell'epitelio. Un meccanismo che mantiene l'inibizione da contatto è mediato dal gene oncosoppressore NF2. Il suo prodotto, la *neurofibromina-2* (NF2 o proteina merlin), facilita l'inibizione da contatto mediata dall'E-caderina.

Via del TGF- β

Le molecole che trasmettono i segnali antiproliferativi alle cellule sono ancora poco noti. Tra queste quella più conosciuta è la proteina **TGF- β** , un membro della famiglia dei fattori di crescita dimerici che include proteine osteomorfogenetiche e attivine. Il TGF- β è un potente inibitore della proliferazione per la maggior

parte delle cellule endoteliali, epiteliali ed ematopoietiche. Esso regola i processi di cellulari legandosi a un complesso molecolare composto dai recettori I e II per il TGF- β . La dimerizzazione del recettore in seguito al legame del ligando comporta una cascata di eventi che determinano l'attivazione trascrizionale di CDKI con attività di inibizione della crescita come MYC, CDK2, CDK4 e quelli codificanti cicline A ed E.

In molte forme di cancro gli effetti inibenti la crescita delle vie mediate da TGF- β sono modificati da mutazioni che interferiscono con il segnale trasmesso da TGF- β . Queste mutazioni possono alterare il recettore di tipo II per il TGF- β o molecole SMAD che hanno la funzione di trasdurre i segnali antiproliferativi dal recettore al nucleo.

In molti tumori la perdita del controllo della crescita mediata dal TGF- β si ha a valle del punto centrale della via di trasduzione del segnale, ad esempio perdita di p21 o persistente espressione di MYC. Queste cellule tumorali possono, quindi, utilizzare altri elementi del programma indotto dal TGF- β , tra cui soppressione-elusione del sistema immunitario o promozione dell'angiogenesi, per facilitare la progressione del tumore. Pertanto, il TGF- β può agire prevenendo o promuovendo la crescita della neoplasia, in relazione allo stato funzionale di altri geni della cellula.

Elusione della morte cellulare

L'apoptosi o morte cellulare programmata, consiste nel normale smantellamento della cellula nelle loro componenti che possono essere consumate e riutilizzate dalle cellule vicine. È ben noto che l'accumulo di cellule neoplastiche può dipendere non solo dall'attivazione di oncogeni promuoventi la crescita o dall'inattivazione di geni onco-soppressori che inibiscono la crescita, ma anche da mutazioni di geni che regolano l'apoptosi.

Il processo apoptotico può essere diviso in un sistema di regolazione, che agisce a monte, è un effettore, a valle. Il sistema di regolazione è distinto in due vie principali, una che interpreta i segnali extracellulari o estrinseci e l'altra che interpreta i segnali intracellulari.

La stimolazione di ciascuna via comporta l'attivazione di una proteasi normalmente inattiva che innesca una cascata proteolitica che coinvolge caspasi "effettrici", le quali smantellano la cellula in modo ordinato. I residui cellulari sono quindi riciclati in maniera efficiente dalle cellule vicine e da fagociti professionali, senza stimolare l'infiammazione.

La **via estrinseca** (recettore di morte) è innescata quando un membro della famiglia dei recettori del TNF, come CD95 (fas), si lega al suo ligando, CD95L, comportando la trimerizzazione del recettore e dei suoi domini apoptotici e citoplasmatici, i quali attraggono la proteina intracellulare adattatrice FADD. Questa proteina recluta la procaspasi-8 a formare il complesso di trasduzione del segnale che determina la morte cellulare.

La **via intrinseca** (mitocondriale) dell'apoptosi è innescata da una varietà di stimoli, tra cui la mancata disponibilità di fattori necessari per la sopravvivenza, stress danni. L'attivazione di questa via comporta la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale e il rilascio di molecole, come il citocromo C, che innescano l'apoptosi.

L'integrità della membrana esterna mitocondriale è regolata da membri pro-apoptotici e anti-apoptotici dalle proteine della famiglia di BCL2. Le proteine pro-apoptosi BAX e BAK sono necessarie per l'apoptosi e promuovono direttamente la permeabilizzazione mitocondriale. La loro azione è inibita da membri anti

apoptotici di questa famiglia di cui sono esempi BCL2 e BCL-X. Un terzo gruppo di proteine, le cosiddette proteine BH3-only, che inducono BAD, BID e PUMA, regolano l'equilibrio tra membri pro e anti apoptotici della famiglia BCL2. Le proteine NH3-only inducono l'apoptosi neutralizzando l'azione delle proteine anti-apoptotiche. Quando la quantità totale dell'insieme delle proteine BH3 supera la barriera proteica antiapoptotica di BCL2/BCL-X, BAX e BAK Sono attivate e formano pori nella membrana mitocondriale. Il citocromo C passa nel cito solo dove si lega ad APAF-1, e attiva le caspasi-9. La caspasi-9 può clivare e attivare caspasi effettrici. Le caspasi possono essere inibite da una famiglia di proteine dette proteine inibitrici dell'apoptosi (IAP).

TP53 è un importante agente a proposto dico che induce l'apoptosi delle cellule in capaci di riparare i danni al DNA. Analogamente, l'azione permanente di geni promuoventi la crescita come MYC determina a sua volta l'apoptosi. Pertanto, entrambe le principali dell'oncogenesi, incapacità di riparare i danni al DNA e attivazione in appropriata di oncogeni, Convergono nei meccanismi dell'apoptosi che, causando la morte cellulare, agisce come barriera principale la cancerogenesi.

Potenziale replicativo illimitato

La maggior parte delle cellule normali 60 o 70 volte. Pertanto, le cellule che perdono la capacità di dividersi entrano in senescenza. questo fenomeno è stato attribuito all'accorciamento progressivo dei telomeri situati all'estremità dei cromosomi. Le conseguenze di questo accorciamento, quando è cospicuo, sono notevoli.

I telomeri accorciati sembrano essere riconosciuti dei meccanismi di riparazione del DNA, come le rotture della doppia elica del DNA, comportando l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza, mediati da TP53 ed RB. Nelle cellule in cui i checkpoint sono disattivati da mutazione a carico di Tp53 o Rb, si attiva, nell'ultimo disperato tentativo di salvare la cellula, la cosiddetta via dell'unione dell'estremità terminale dei cromosomi non omologhi, unendo cioè l'estremità accorciata di due cromosomi.

Un meccanismo di riparazione così improprio determina la formazione di cromosomi di centri che vengono raggruppati separatamente in anafase con conseguenti nuove rottura del DNA a doppia elica. L'instabilità del genoma che risulta dalla ripetizione dei cicli ponte-fusione-rottura può determinare una *catastrofe mitotica* caratterizzata da apoptosi massiva.

Di conseguenza per i tumori che crescono in modo indefinito, la perdita dei meccanismi limitanti la crescita non è sufficiente. Lasciano le tumorali devono anche sviluppare meccanismi per evitare la senescenza e la catastrofe mitotica.

Se durante la crisi una cellula riesce a riattivare la telomerasi, i cicli ponte-fusione-rottura cessano e la cellula può evitare l'apoptosi. Comunque, durante questo periodo di stabilità del genoma che procede all'attivazione della telomerasi, si possono accumulare numerose mutazioni e favorendo la progressione della cellula verso la trasformazione maligna. La telomerasi, attiva nelle cellule staminali normali, è di norma assente o è presente a livelli molto bassi nella maggior parte delle cellule somatiche.

Nell'85-95% dei tumori ciò dipende dalla regolazione positiva dell'enzima telomerasi. Alcuni tumori utilizzano altri meccanismi, denominati allungamento alternativo dei telomeri, probabilmente indipendenti dalla ricombinazione del DNA.

Sequenza di eventi nello sviluppo del potenziale replicativo illimitato. Le replicazione delle cellule somatiche, che non esprime la telomerasi, determina l'accorciamento dei telomeri. In presenza di relativi checkpoint, le cellule si arrestano ed entra in senescenza non replicativa. In assenza dei check point, le vie di riparazione del DNA sono attivate in modo inappropriato, determinando la formazione di cromosomi dicentrici. Con la mitosi, i cromosomi di centri ci sono separati, generando rotture casuale della doppia elica che, allora volta, attivano le vie di riparazione del DNA determinando l'associazione casuale al fine e inizio della doppia elica di cromosomi dicentrici. Le cellule vanno incontro a numerose ripetizioni di questo ciclo ponte-fusione-rottura, che genera un'instabilità cromosomica massiva e numerose mutazioni. se le cellule non sono in grado di esprimere nuovamente la telomerasi, vanno incontro a catastrofe mitotica e apoptosi. la repressione della telomerasi consente alle cellule di evitare il ciclo ponte-fusione-rottura, promuovendo pertanto la loro sopravvivenza e la cancerogenesi.

Il potenziale replicativo illimitato, caratteristico delle cellule tumorali, è una proprietà verosimilmente legato a tre fattori interconnessi:

- Capacità di eludere il processo di senescenza. Dopo un certo numero di replicazioni, la cellula normale smette di dividersi e comincia di invecchiare. i meccanismi molecolari coinvolti sono l'attivazione di p53 e di i NK4/p16; l'azione è almeno in parte legata al mantenimento della funzione Rb. Nella gran parte dei tumori, il checkpoint G1/S è mal funzionante, e quindi la cellula tumorale eluderebbe così la morte cellulare.
- Capacità di eludere la crisi mitotica. Potrebbe conseguire alla riacquisizione della capacità di esprimere la telomerasi oppure al fatto che il processo di cancerogenesi riguarda una cellula staminale.
- Auto rinnovamento. Si ritiene che la massa delle cellule che costituiscono un tumore venga alimentata da una cellula staminale tumorale, che potrebbe derivare dalla trasformazione di una cellula staminale normale, o dalla trasformazione di una cellula progenitrice che acquista il carattere di staminali ta, ovvero di auto rinnovarsi).