

LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ (HDL)

LE LIPOPROTEINE AD ALTA DENSITÀ: UNO STRUMENTO POLIVALENTE CONTRO IL CANCRO?

High density lipoproteins as a multitasking tool to fight cancer

ALICE OSSOLI, MONICA GOMARASCHI*Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano***SUMMARY**

High density lipoproteins are well known for their cardioprotective role. Their ability to inhibit the development and progression of atherosclerosis is likely due to their role in the reverse transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion and to their antioxidant and anti-inflammatory properties. Since lipids, oxidative stress and inflammation can promote cancer cell proliferation, HDL could affect tumor development and progression through the same mechanisms as well. Several alterations of cellular metabolism, including those affecting cholesterol, are shared by many types of cancers. Besides fatty acids, cholesterol and its metabolites were shown to play a key role in cancer cell proliferation. In this context, when cancer cells are exposed to HDL, cholesterol content is reduced, with an overall rewiring of cell metabolism. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies showed that HDL could limit the formation and availability of pro-oxidant and pro-inflammatory molecules in the tumor microenvironment. Here, HDL can also promote immune surveillance and reduce angiogenesis. Finally, HDL-like particles can be used as delivery agents for the selective uptake of antineoplastic agents by cancer cells, thanks to their binding to the scavenger receptor BI. In this context, a key advantage is that the delivery agent has an intrinsic antitumor activity *per se*, thus likely rendering cancer cells more sensitive to antineoplastic agents.

Key words: *High density lipoproteins; cancer; tumor microenvironment; drug delivery.*

Dall'arteriosclerosi al tumore: una condivisione di fattori predisponenti

Lipoproteine ad alta densità e ateroprotezione

Al contrario delle lipoproteine contenenti apolipoproteina B (apoB), le HDL sono ben note per la loro attività protettiva

Indirizzo per la corrispondenza

Monica Gomaraschi, Centro Enrica Grossi Paoletti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano
Via Balzaretti 9, 20133 Milano
E-mail: monica.gomaraschi@unimi.it

Elenco degli argomenti trattati

- L'arteriosclerosi e il tumore condividono numerosi fattori predisponenti l'insorgenza e la progressione della patologia, tra cui i lipidi, lo stress ossidativo e l'infiammazione. Le HDL modulano l'omeostasi del colesterolo cellulare e hanno azioni antiossidanti e antinfiammatorie; pertanto, attraverso questi meccanismi potrebbero opporsi non solo al processo arteriosclerotico ma anche tumorale.
- Le evidenze epidemiologiche relative all'associazione tra livelli plasmatici di HDL-C e insorgenza di varie forme di tumore sono ad oggi contraddittorie. Al contrario, la relazione tra HDL-C e prognosi è ben nota: livelli più elevati di HDL-C si associano a riduzione della mortalità e dell'incidenza di recidiva.
- Studi *in vitro* ed in modelli animali hanno evidenziato che le HDL riducono la proliferazione delle cellule tumorali modulando il contenuto di colesterolo cellulare e/o dei suoi metaboliti, riducendo la presenza di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, e limitando la tolleranza immunitaria.
- Le HDL ricostituite possono essere utilizzate come veicolo per i farmaci antineoplastici, aumentandone la captazione selettiva nella massa tumorale. Tale approccio aumenta la tollerabilità dei farmaci ed il loro effetto citotossico.

contro l'insorgenza e lo sviluppo delle placche aterosclerotiche (1). La maggioranza delle HDL circolanti ha forma sferica, mentre una percentuale tra il 10 ed il 15% ha forma discoidale. Nelle particelle sferiche, il core di lipidi apolari (esteri del colesterolo e trigliceridi) è circondato da uno strato superficiale di lipidi anfipatici, quali fosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo non esterificato, e di apolipoproteine (2). Nelle particelle discoidali, il core è assente. La principale componente proteica delle HDL è l'apoA-I, che presenta la classica struttura ad α -eliche anfipatiche (2). Oltre alla sua azione strutturale, l'apoA-I esercita un ruolo chiave nel metabolismo e nella funzionalità delle HDL, agendo da cofattore enzimatico e da ligando per recettori e trasportatori. La maggioranza delle HDL si forma per sinte-

si e secrezione dell'apoA-I da parte di epatociti ed enterociti; l'apoA-I viene immediatamente lipidata per interazione con il trasportatore di colesterolo e fosfolipidi ATP-binding cassette A1 (ABCA1) con formazione delle HDL discoidali, convertire poi in particelle sferiche per azione della lecitina:colesterolo aciltransferasi (3).

Storicamente, l'azione ateroprotettiva delle HDL si ascrive al loro ruolo centrale nel processo noto come "trasporto inverso del colesterolo". In tale processo, il colesterolo viene trasportato dai tessuti periferici, inclusa la parete arteriosa, al fegato per l'eliminazione e le HDL rappresentano il principale veicolo di questo trasporto (3). Il trasporto inverso del colesterolo è considerato un processo chiave dell'omeostasi cellulare di colesterolo, poiché, contrariamente agli epatociti, la maggioranza delle cellule non è in grado di catabolizzarlo. Il primo *step* del trasporto inverso è l'efflusso di colesterolo cellulare verso accettori extracellulari. L'apoA-I non lipidata e le HDL discoidali sono i principali accettori nell'efflusso mediato dai trasportatori della famiglia *ATP-binding cassette* ABCA1 e G1, processo attivo e saturabile. Le HDL sferiche sono invece accettori di colesterolo nel processo mediato dal recettore *scavenger* di tipo BI (SR-BI) in seguito al legame con l'apoA-I (3). In questo caso, SR-BI favorisce la diffusione di colesterolo secondo gradiente di concentrazione, potendo potenzialmente promuoverne l'influsso. SR-BI è anche espresso sulla superficie degli epatociti, dove media la captazione selettiva di colesterolo dalle HDL senza endocitosi della lipoproteina (4). Questo processo di captazione si differenzia da quello delle lipoproteine contenenti apoB, in cui la lipoproteina viene internalizzata e degradata nel compartimento lisosomiale.

Le HDL esercitano numerose altre azioni che possono contribuire alla loro attività

anti-aterogena. Hanno azione antiossidante, poiché possono captare i lipidi ossidati e spegnere la cascata ossidativa grazie alla loro componente proteica. Inoltre, le HDL hanno azione antinfiammatoria verso numerosi tipi cellulari coinvolti nel processo arteriosclerotico, quali cellule endoteliali e immunitarie, azione antitrombotica e di regolazione della sintesi di numerose molecole vasoattive (5). Molte di queste proprietà possono essere rilevanti non solo per la patogenesi dell'arteriosclerosi, ma anche per rallentare la progressione di alcuni tipi di tumori (6). Le HDL possono infiltrarsi nella massa tumorale grazie alla loro dimensione ridotta ed interagire direttamente con le cellule tumorali, che generalmente esprimono SR-BI in elevate quantità (7).

Alterazioni metaboliche delle cellule tumorali

Dal punto di vista metabolico, l'elevata velocità di proliferazione delle cellule tumorali deve essere supportata da una aumentata disponibilità di molecole quali acidi nucleici, proteine e lipidi. Pertanto, il metabolismo cellulare subisce modifiche atte ad aumentare la capacità di sintetizzare ed accumulare i precursori di tali molecole. Generalmente, queste alterazioni metaboliche sono comuni a tumori di diverso tipo ed eziologia e sono indotte da mutazioni genetiche o modificazioni epigenetiche. Normalmente, le cellule utilizzano gli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale per la produzione di ATP; al contrario, le cellule tumorali utilizzano la glicolisi anaerobica come fonte di energia, soprattutto a livello del core ipossico della massa tumorale. Tuttavia, la glicolisi può avvenire anche in condizioni aerobiche, il cosiddetto "effetto Warburg", come osservato nel 70-80% dei tumori. Questo effetto è anch'esso dovuto a instabilità e/o aberrazioni genetiche, con conseguenti alterazio-

ni coordinate di numerose vie di segnale. Inoltre, lo spostamento del bilancio energetico verso la glicolisi può essere il risultato di una disfunzione mitocondriale, che riduce l'efficacia del processo di fosforilazione ossidativa con parallelo aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tale disfunzione è spesso guidata da mutazioni a livello dei geni codificanti per componenti del ciclo degli acidi tricarbossilici e della catena di trasporto degli elettroni (9).

Anche il metabolismo lipidico subisce importanti alterazioni nelle cellule tumorali. La principale e meglio descritta è l'aumento della sintesi *de novo* degli acidi grassi (FA), necessari per la formazione delle membrane di cellule e organelli e come fonte di molecole segnale. Infatti, numerosi enzimi di questa via biosintetica sono maggiormente espressi in molti tipi di tumore e rappresentano possibili nuovi bersagli terapeutici (10). Le cellule tumorali possono anche captare gli acidi grassi dall'ambiente extracellulare attraverso diversi trasportatori di membrana. L'espressione degli enzimi coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi e dei loro trasportatori è principalmente regolata dal fattore di trascrizione *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1) (10). Anche il colesterolo è fondamentale per la proliferazione delle cellule tumorali, sia come componente strutturale delle membrane, sia per il suo ruolo in diverse funzioni cellulari (11). Ad esempio, la presenza del colesterolo nelle *lipid rafts* regola l'attivazione dei recettori transmembrana ivi presenti, inclusi quelli per i fattori di crescita, e le vie di segnale intracellulari a valle. Inoltre, il colesterolo può essere convertito in molecole biologicamente attive quali ossisteroli, isoprenoidi e ormoni. Il colesterolo può essere direttamente sintetizzato dalla cellula tumorale o può essere captato dalle lipoproteine presenti nel microam-

biente tumorale (TME). Anche se in molti tipi di tumori è stato descritto un aumento della sua sintesi, le fonti endogene di colesterolo nel TME sono preferibili, poiché la via biosintetica del mevalonato è un processo più lungo e dispendioso dal punto di vista energetico. L'espressione di enzimi, trasportatori e recettori coinvolti nella sintesi e nella captazione di colesterolo sono regolati principalmente da SREBP-2, che è attivato da vie di segnale oncogeniche, quali PI3K/Akt/mTORC1 o MYC, e dall'ipossia tipica del TME (12). Lungo la via del mevalonato, anche la produzione di isoprenoidi (farnesil-pirofosfato e geranylgeranyl-pirofosfato) è aumentata nelle cellule tumorali. Al contrario, l'espressione dei geni regolati dai *liver X receptor* (LXR), inclusi i trasportatori della famiglia ABC responsabili dell'efflusso di colesterolo, è ridotta, con l'effetto netto di un accumulo intracellulare di colesterolo (12). Le cellule possono convertire il colesterolo in ossisteroli per ossidazione spontanee o enzimatica. La conversione enzimatica è mediata dai citocromi della famiglia P450; in modo interessante, le cellule tumorali possono presentare una alterazione dell'espressione di alcuni citocromi rispetto alle cellule non trasformate da cui si sono originate. Di conseguenza, alcuni ossisteroli possono essere prodotti in quantità maggiori nelle cellule tumorali, mentre altri sono generati in quantità minori (13).

Il ruolo del microambiente tumorale

La progressione del tumore è profondamente influenzata dalle interazioni tra le cellule cancerogene e microambiente circostante. Il TME si compone di una serie di cellule residenti ed infiltranti il tessuto, proteine della matrice extracellulare e fattori solubili e può influenzare lo sviluppo, la progressione, il potenziale invasivo e metastatico del tumore, nonché la sua risposta

ai farmaci antineoplastici (14). Essendo ipossico e acido, il TME stimola l'angiogenesi al fine di aumentare l'afflusso di ossigeno e nutrienti e di rimuovere i cataboliti. I principali componenti cellulari del TME sono cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, fibroblasti e adipociti, mentre i fattori solubili comprendono citochine, fattori di crescita, lipidi e ormoni. In particolare, il TME è ricco di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, che giungono dalla circolazione sistemica o possono essere prodotte localmente.

Per quanto riguarda le cellule del sistema immunitario, nel TME sono presenti sia componenti dell'immunità innata (macrofagi, neutrofilii, cellule dendritiche e *natural killer*) che adattativa (linfociti T e B); queste cellule interagiscono con le cellule tumorali direttamente oppure indirettamente tramite il rilascio di citochine e chemochine (15). Il ruolo delle cellule immunitarie è complesso, poiché esse possono sia promuovere che inibire la crescita tumorale. Ad esempio, i macrofagi (*tumor associated macrophages*, TAM) possono rappresentare fino al 50% della massa tumorale. Tuttavia, mentre quelli con fenotipo M1 sono pro-infiammatori e hanno azione tumoricida, quelli con fenotipo M2 sono antinfiammatori e favoriscono la tolleranza immunitaria, nonché la resistenza agli antineoplastici. Poiché l'ipossia e diverse citochine nel TME possono favorire il differenziamento dei TAM verso il fenotipo M2, non sorprende che un maggior contenuto di TAM nella massa tumorale sia associato ad una prognosi peggiore nel tumore al seno, al polmone e allo stomaco (14). Similmente, le cellule dendritiche connettono l'immunità innata con quella adattativa grazie alla loro capacità di processare e presentare l'antigene, stimolando così il reclutamento nel sito tumorale e l'attivazione dei linfociti CD8+ ad azione citotossica. Tutta-

via, le citochine secrete nel TME inducono immunotolleranza delle dendritiche verso le cellule tumorali, bloccando quindi la risposta citotossica a valle. Inoltre, il TME promuove la migrazione di progenitori mieloidi immaturi (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) nella massa tumorale, dove sopprimono la risposta immunitaria e possono differenziare a TAM (15). Le cellule endoteliali in risposta all'ambiente ipossico rilasciano fattori promuoventi la neoangiogenesi, favorendo così la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno della massa tumorale. Inoltre, esse rilasciano fattori solubili che riducono il reclutamento nel TME e la funzionalità dei linfociti T, nonché in presenza di TGF- β possono trasformarsi in fibroblasti (*cancer associated fibroblasts*, CAF) (14). Il ruolo dei CAF è fondamentale nella progressione della patologia, poiché rilasciando quantità elevate di fattori di crescita, citochine e componenti della matrice extracellulare supportano la proliferazione e la metastatizzazione del tumore, la neoangiogenesi e la tolleranza immunitaria (14).

Il TME è ricco di lipidi, quali colesterolo, acidi grassi ed un ampio spettro di loro metaboliti. Essi possono essere veicolati alle cellule tumorali dalle lipoproteine oppure da altre cellule presenti nel TME, come gli adipociti. Anche in questo caso, le varie specie lipidiche possono essere associate a progressione o ad inibizione del tumore. Ad esempio, le cellule immunitarie nel TME possono generare eicosanoidi dall'acido arachidonico per azione di lipossigenasi e ciclossigenasi. Alcuni di questi eicosanoidi, come le resolvine, possono agire da soppressori tumorali, inibendo la proliferazione e il potenziale metastatico delle cellule cancerogene, la neoangiogenesi e riattivando la risposta immunitaria in molte forme tumorali. Al contrario, altri eicosanoidi, quali il trombossano A2 e la prostaglandina E2, hanno azione pro-tumori-

genica, come dimostrato nel carcinoma mammario, prostatico e ovarico (11). Anche gli ossisteroli possono esercitare azioni opposte sulla massa tumorale. Essi generalmente inibiscono la proliferazione cellulare grazie alla loro attività antinfiammatoria e immunostimolante. Tuttavia, alcuni ossisteroli, in particolare il 27-idrossicolesterolo, possono supportare la crescita tumorale, come evidenziato nel tumore al seno (13).

Le lipoproteine rappresentano sicuramente una fonte preferenziale di lipidi nel TME. Molti recettori per le lipoproteine sono sovraespressi nelle cellule tumorali rispetto alle cellule di origine. Generalmente, tale sovraespressione riguarda sia i recettori per le lipoproteine contenenti apoB, come il recettore per le LDL, sia il recettore per le HDL, SR-BI. Similmente al processo arteriosclerotico, il TME favorisce l'ossidazione delle LDL; queste ultime, oltre a fornire lipidi, possono attivare cascate pro-infiammatorie, pro-ossidanti e pro-angiogeniche anche grazie all'interazione con il proprio recettore LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), anch'esso molto espresso in numerosi tipi di tumore (16). Al contrario, le HDL possono promuovere l'efflusso di colesterolo dalle cellule tumorali mediante l'interazione con i trasportatori ABC e SR-BI. Tuttavia, poiché SR-BI favorisce la diffusione per gradiente di concentrazione del colesterolo, il suo legame con le HDL può causare influsso e quindi aumento del colesterolo cellulare, come precedentemente discusso.

HDL-colesterolo e tumore: le evidenze epidemiologiche

Numerosi studi hanno analizzato la relazione tra i livelli plasmatici di HDL-colesterolo (HDL-C) ed il rischio di tumore. Tali studi sono stati condotti in modo retrospet-

tivo, prospettico o mediante randomizzazione mendeliana. Gli studi retrospettivi hanno fornito risultati fortemente discordanti, poiché sono state evidenziate associazioni positive, negative o nulle tra i valori plasmatici di lipidi/lipoproteine e l'incidenza di diverse forme di tumore (11, 17). Numerose considerazioni potrebbero spiegare le incongruenze osservate, a partire dal tipo di tumore e dal momento in cui i valori lipidici sono stati misurati. È infatti ben noto che lo stadio della malattia e le terapie antitumorali possono alterare i valori lipidici, in particolare le concentrazioni di HDL-C e apoA-I. Il potenziale predittivo di bassi valori di apoA-I è talmente elevato da essere inclusi nello screening per il tumore ovarico insieme a biomarcatori tradizionali (18). Nel caso di forme tumorali del fegato e dell'intestino, la riduzione di HDL-C può essere spiegata da una ridotta biosintesi delle HDL, essendo questi due organi responsabili della sintesi dell'apoA-I. Più in generale, il tumore innesca una risposta infiammatoria che può inibire la sintesi ed il metabolismo delle HDL come accade in molti altri stati infiammatori; infatti, le citochine pro-infiammatorie inibiscono la sintesi epatica di numerose proteine coinvolte nel metabolismo lipidico (17).

Per quanto riguarda gli studi prospettici, sono disponibili sia studi singoli che metanalisi. Nello studio *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) è stata dimostrata l'esistenza di un'associazione inversa tra HDL-C e rischio di tumore del colon e dell'endometrio (19, 20). Tale associazione è stata confermata nello studio *Alpha-Tocopherol Beta-carotene lung cancer prevention* (ATBC) e nel *Women's Health Study*, condotti in una popolazione di sesso maschile e femminile, rispettivamente (21, 22). Recentemente sono stati pubblicati i risultati di due studi condotti sulle coorti del *Copenhagen Gene-*

ral Population Study e del *Copenhagen City Heart Study* (23). L'associazione tra bassi livelli di HDL-C e apoA-I ed il rischio di tumore è stata confermata in entrambi i sessi; tale associazione è risultata particolarmente evidente per il mieloma multiplo, le forme mieloproliferative, il linfoma non-Hodgkin, i carcinomi mammari, polmonari e del sistema nervoso.

Gli studi di randomizzazione mendeliana sono stati condotti per indagare il possibile legame causativo tra basse HDL e sviluppo di tumore. Ad oggi, i risultati disponibili sono contrastanti. Nella casistica del *Breast Cancer Association Consortium* (BCAC), livelli geneticamente elevati di HDL-C sono associati ad un aumento del rischio di tumore al seno indipendentemente dall'espressione del recettore per gli estrogeni (24). Similmente, livelli elevati di HDL-C sono associati ad un aumentato rischio di tumore dell'endometrio nel *Endometrial Cancer Association Consortium* e nel *Global Lipids Genetic Consortium* (25). Al contrario, nessuna associazione è stata evidenziata tra livelli geneticamente determinati di HDL-C e rischio di carcinoma prostatico e del colon (26).

La relazione tra HDL-C o apoA-I e prognosi è invece ben definita. Una recente metanalisi, che ha incluso studi retrospettivi e prospettici, ha evidenziato una riduzione del rischio di morte del 37% e di recidiva del 35% nei pazienti con valori di HDL-C più elevati (27). Dati suddivisi per sede del tumore sono disponibili per il polmone, il tratto naso-faringeo, il colon ed il seno. Inoltre, basse concentrazioni di apoA-I prima dell'inizio della terapia antitumorale sono stati associati ad un aumentato rischio di metastatizzazione e prognosi più severa (28, 29). Infine, in pazienti con carcinoma mammario triplo negativo, un rapporto HDL-C/colesterolo totale più elevato si associa ad una significativa riduzione della mortalità (30).

Effetti delle HDL su sviluppo e progressione del tumore: evidenze *in vitro* ed *in vivo*

La manipolazione genetica dell'animale da esperimento per espressione dell'apoA-I umana o delezione dell'apoA-I murina consente di studiare il possibile legame causativo tra HDL e tumore. Nel topo transgenico per l'apoA-I umana (hA-ITg), che presenta valori di HDL-C molto elevati, la crescita della massa tumorale dopo iniezione di cellule di melanoma, di tumore del polmone o ovarico si è ridotta in modo significativo rispetto a quanto osservato nell'animale *wild-type* (31, 32). Al contrario, la delezione del gene dell'apoA-I murina (A-IKO), che comporta una riduzione marcata dei livelli di HDL-C, si associa ad una maggiore crescita tumorale rispetto all'animale *wild-type* (31). Nel topo A-IKO è stato testato anche l'effetto della somministrazione di apoA-I esogena, che ha causato una riduzione del volume della massa tumorale sia quando utilizzata prima dell'infusione di cellule di melanoma metastatico B16F10L, sia quando somministrata dopo l'inoculo (31). Tuttavia, ci sono anche evidenze opposte. Nel topo transgenico PyMT, modello animale di carcinoma mammario, la sovraespressione di apoA-I umana non modifica né il tempo di latenza, né la dimensione del tumore (33). Inoltre, la delezione di apoA-I ha causato una riduzione della massa tumorale in topi a cui sono state iniettate cellule tumorali prostatiche (34). Pertanto, la manipolazione genetica dell'animale per modificare i livelli di HDL ha generato risultati contrapposti in base al tipo e alla sede del tumore. Le cause di tali discrepanze non sono ad oggi note, ma potrebbero in parte risiedere nella differente avidità di colesterolo extracellulare delle varie forme tumorali, la cui fonte principale nel topo è rappresentata dalle HDL; in particolare, i tumori

ormone-dipendenti potrebbero avere una maggiore necessità di colesterolo per la sintesi locale di ormoni.

Studi condotti su modelli cellulari e animali hanno fornito alcune evidenze sui meccanismi alla base dell'effetto antiproliferativo delle HDL (Figura 1). Gli studi *in vivo* presentano l'ovvio vantaggio di evidenziare non solo effetti diretti delle lipoproteine sulle cellule tumorali, ma anche effetti sistemici o locali su altri componenti del TME. Le HDL sono in grado di ridurre la vitalità e la proliferazione di cellule tumorali di varia origine, tra cui ovaio, prostata, seno e melanoma (11, 32). Tale effetto è stato correlato ad una modulazione del metabolismo cellulare, ed in particolare del contenuto di colesterolo e ossisteroli (Figura 1). In modo interessante, la riduzione di colesterolo è stata causata non solo dalla promozione dell'efflusso, ma anche da una inibizione della via del mevalonato, come

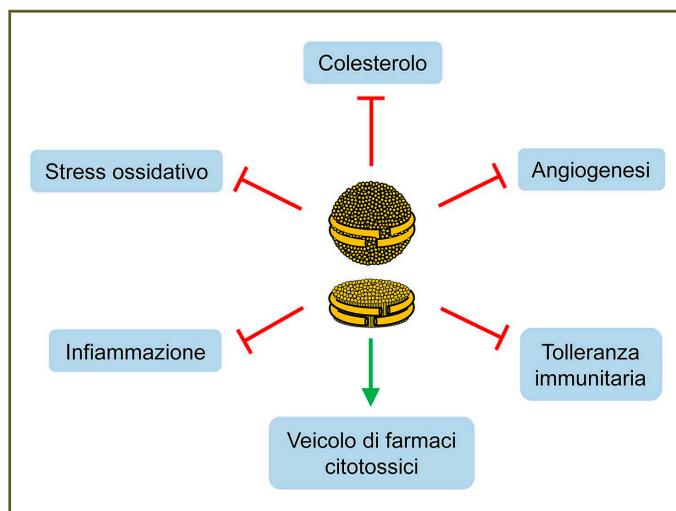


Figura 1 - Ruolo antitumorale delle HDL.

Le HDL possono limitare lo sviluppo e la progressione del tumore agendo direttamente sulle cellule tumorali oppure indirettamente, modificando il microambiente tumorale. Le HDL riducono i livelli di colesterolo e dei suoi metaboliti, di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie, inibiscono l'angiogenesi e la tolleranza immunitaria. Inoltre, le HDL possono essere utilizzate come veicolo di farmaci antineoplastici per aumentarne la captazione nella massa tumorale.

evidenziato nel topo hA-ITg (31), a suggerire un'alterazione globale del metabolismo cellulare. In accordo con tale ipotesi, è stata dimostrata anche una inibizione intratumorale della sintesi *de novo* della serina nel topo hA-ITg rispetto al topo A-IKO (35); poiché la serina è essenziale per la sintesi di glicina, proteine, lipidi e acidi nucleici, la riduzione della sua disponibilità potrebbe giocare un ruolo chiave nel ridurre la proliferazione tumorale. Al contrario, alcuni studi hanno evidenziato un aumento del contenuto di colesterolo in cellule tumorali esposte alle HDL; ad esempio, in cellule di carcinoma mammario e prostatico, le concentrazioni di colesterolo o di ossisteroli sono aumentati in seguito al trattamento con HDL in modo dipendente dall'espressione di SR-BI (11). Anche in cellule di carcinoma renale l'espressione di SR-BI correla con il contenuto di colesterolo e ossisteroli (36). Nel modello animale di tumore al seno PyMT, l'espressione di apoA-I umana si associa ad un aumento delle concentrazioni di 27-idrossicolesterolo sia per influsso dalle HDL, sia per inibizione del Cyp7b1, l'enzima responsabile del suo catabolismo (33). Le discrepanze osservate potrebbero trovare parziale spiegazione nei differenti disegni sperimentali utilizzati nei vari studi. Ad esempio, numerosi studi *in vitro* sono stati condotti in deprivazione di siero o con siero delipidizzato; in queste condizioni, le HDL rappresentano l'unica fonte di lipidi nel mezzo di coltura. In linea con questa ipotesi, quando LDL o HDL sono state iniettate in topi con tumori generati per inoculo di cellule CT26 del colon, le LDL sono state captate dalle cellule tumorali, mentre le HDL preferenzialmente dai TAM (37). In accordo, il silenziamento genico del recettore per le LDL si è dimostrato efficace nel ridurre la vitalità cellulare in modelli animali di tipi di tumore, quali l'adenocarcinoma pancreatico ed il tumore al

seno HER2-positivo o triplo negativo (11). Infine, è ben noto come le HDL possano diventare disfunzionali in numerose condizioni patologiche, come gli stati infiammatori, le malattie metaboliche ed anche il tumore (38). Ad esempio, la proliferazione della linea cellulare di tumore al seno MCF-7 è aumentata in seguito al trattamento con HDL isolate da pazienti diabetici, ma non con le lipoproteine isolate da controlli sani (39).

Anche gli effetti antinfiammatori ed antiossidanti potrebbero contribuire al ruolo antiproliferativo delle HDL (*Figura 1*). Ad esempio, in cellule di carcinoma ovarico il contenuto di acido lisofosfatidico, molecola ad azione pro-infiammatoria, si è ridotto in seguito al trattamento con apoA-I, con conseguente riduzione della proliferazione, migrazione ed invasione cellulare (32). In linee cellulari di carcinoma prostatico, le HDL riducono lo stress ossidativo e la proliferazione cellulare indotta da ROS grazie all'azione sia della componente proteica che lipidica (40). Infine, studi in modelli animali hanno consentito di evidenziare importanti effetti delle HDL sulle cellule immunitarie presenti nel TME (*Figura 1*). Ad esempio, le HDL inibiscono il reclutamento e l'attività delle MDSC nel TME grazie al legame con SR-BI, con conseguente riduzione della tolleranza immunitaria; infatti, il numero di TAM con fenotipo classico M1 e di linfociti CD8+ citotossici presenti nel TME è risultato aumentato (41).

Le HDL come veicolo per farmaci antineoplastici

Le HDL possono essere ricostituite *in vitro* a partire da apoA-I e fosfolipidi (rHDL) (2). Queste particelle di forma discoidale mantengono le proprietà delle HDL circolanti e sono in fase di sviluppo clinico come potenziali nuovi agenti anti-aterosclerotici.

Un vantaggio delle rHDL è rappresentato dal fatto che le loro caratteristiche possono essere ottimizzate variandone la composizione, rendendole quindi potenzialmente utili per una serie di applicazioni differenti. Le modifiche della composizione possono riguardare sia la componente lipidica che la componente proteica, dove l'apoA-I può essere sostituita da piccoli peptidi apoA-I mimetici (42). Tra le applicazioni oggetto di maggiore studio negli ultimi anni, vi è l'uso delle rHDL come veicolo di farmaci idrofobici, che possono essere inclusi nel core della lipoproteina, o anfipatici, che si inseriscono nello strato fosfolipidico (*Figura 1*). I vantaggi delle rHDL includono la loro biocompatibilità, l'elevata capacità, la lunga emivita, la possibilità di controllare il rilascio del farmaco e la loro selettività per la massa tumorale mediata dal legame con SR-BI, che le rendono utili non solo per veicolare farmaci ma anche come marcatori nella diagnostica per immagini (42). In realtà, le LDL sono state le prime candidate come veicolo di farmaci; tuttavia, la loro captazione avviene per endocitosi mediata da recettore con conseguente degradazione lisosomiale anche del farmaco veicolato (42). Al contrario, l'interazione delle HDL con SR-BI comporta la captazione del loro contenuto direttamente nel compartimento citosolico, evitando la degradazione nel lisosoma. Inoltre, le dimensioni ridotte delle HDL rispetto alle LDL le rende capaci di diffondere attraverso i capillari e raggiungere efficacemente il TME. HDL ricostituite sono in fase di sviluppo per diversi tipi di tumori e trasportano non solo farmaci antineoplastici, ma anche siRNA e miRNA (42). Paclitaxel, docetaxel e doxorubicina sono esempi di classici farmaci antineoplastici la cui inclusione in rHDL è in fase di studio. Ad esempio, Wang *et al.* hanno evidenziato come il paclitaxel incluso in rHDL (rHDL/PTX) sia meglio tollerato rispetto al farma-

co libero o complessato con albumina, a causa di una maggiore captazione da parte delle cellule tumorali (43); infatti, l'effetto citotossico massimo su varie linee cellulari tumorali, quali MCF7, DU145, OV1063 e OVCAR-3, si ottiene con concentrazioni mi-

Glossario

Cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC): popolazione eterogenea di cellule immunitarie di origine mieloide caratterizzate da un fenotipo immaturo e dalla capacità di sopprimere l'attività di linfociti T.

Citocromi P450: famiglia di enzimi ossidanti coinvolti nella sintesi e nel metabolismo di molecole di varia natura. Hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo degli xenobiotici. Sono espressi in tutti i tessuti, ma in particolare nel fegato.

Effetto Warburg: fenomeno caratterizzato da un aumento della captazione cellulare di glucosio e della produzione di energia per glicolisi anche in presenza di ossigeno.

Endocitosi delle lipoproteine: processo di captazione cellulare delle lipoproteine circolanti mediato principalmente dai recettori della famiglia *LDL-receptor*. Il complesso lipoproteina-recettore viene internalizzato e veicolato al lisosoma per la degradazione nei componenti basilari quali aminoacidi, colesterolo non esterificato e acidi grassi.

Fosforilazione ossidativa: processo metabolico che porta alla sintesi di ATP grazie al gradiente elettrochimico generato nei mitocondri.

Glicolisi: sequenza di reazioni enzimatiche che porta alla conversione del glucosio in piruvato.

Liver X receptors (LXR): famiglia di recettori nucleari attivati dagli ossisteroli. LXR α è espresso soprattutto nel fegato, mentre LXR β è ubiquitario. I recettori LXR esercitano un ruolo chiave nel metabolismo cellulare, regolando l'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi del colesterolo, degli acidi grassi e del glucosio.

Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP): famiglia di fattori di trascrizione composta da due geni (SREBF1 e SREBF2) codificanti tre diverse proteine: SREBP1a, SREBP1c e SREBP2. Regolano la trascrizione di geni coinvolti nella biosintesi e captazione di lipidi e lipoproteine.

Studi di randomizzazione mendeliana: studi epidemiologici in cui si utilizzano varianti geniche per indagare l'associazione causativa tra un fattore di rischio modificabile ed il rischio o la prognosi di una patologia.

norini di rHDL/PTX rispetto al farmaco libero (44). Recentemente, il paclitaxel è stato co-incapsulato nelle rHDL con il nuovo inibitore della glicoproteina P, HZ208, che ha comportato un ulteriore aumento della tollerabilità e della selettività per le cellule tumorali (45). Anche l'uso della doxorubicina è limitato dalla sua tossicità, in particolare a livello cardiaco, e dall'insorgenza di resistenza. La sua inclusione in rHDL è stata testata nel carcinoma epatocellulare, evidenziando un aumento dell'accumulo intracellulare e dell'effetto citotossico rispetto al farmaco libero. Tra i farmaci innovativi è stato testato il complesso immunostimolante MTP10 (*muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine*) in un modello murino di melanoma; la sua inclusione in rHDL ha comportato una significativa captazione nel midollo osseo, con un accumulo marginale o pressoché nullo nel fegato e in altri organi vitali. Il trattamento ha così inibito la crescita della massa tumorale, aumentando la risposta del sistema immunitario alla terapia con bloccanti di PD-1 (46). Infine, le rHDL potrebbero essere utilizzate nei tumori cerebrali per consentire ai farmaci an-

tineoplastici di passare la barriera ematoencefalica. Ad esempio, il docetaxel e un agonista del recettore Toll-like 9 sono stati inclusi in rHDL ed infusi in modelli animali di glioblastoma multiforme; il trattamento ha causato un aumento della risposta citotossica mediata dai linfociti CD8+, la regressione della massa tumorale e l'aumento della sopravvivenza (47). Ulteriori esempi di farmaci inclusi in rHDL sono la valrubicina, la aclacinomicina ed il glicoside garcina (48).

Conclusioni e prospettive

Lo sviluppo delle HDL come veicolo di farmaci è un campo innovativo che ha un grande potenziale per la terapia antitumorale. Infatti, grazie alla loro lunga emivita, stabilità e sicurezza rappresentano una valida opzione per superare diverse problematiche che ostacolano l'uso di farmaci antineoplastici altamente efficaci. Le HDL presentano un ulteriore vantaggio chiave: il fatto di poter esercitare di per sé un'azione antitumorale. Pertanto, potrebbero non solo veicolare il farmaco in modo selettivo

RIASSUNTO

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono ben note per la loro attività protettiva contro lo sviluppo e la progressione dell'arteriosclerosi. Tale attività è generalmente ascritta al ruolo centrale svolto dalle HDL nel trasporto inverso del colesterolo dai tessuti periferici al fegato per l'eliminazione, alle loro proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie. Attraverso gli stessi meccanismi, le HDL potrebbero anche influenzare la proliferazione delle cellule tumorali e quindi la progressione del tumore stesso. Numerose alterazioni del metabolismo cellulare sono presenti in forme tumorali diverse, incluse le variazioni del metabolismo lipidico. In questo contesto, giocano un ruolo fondamentale non solo gli acidi grassi, ma anche il colesterolo ed i suoi numerosi metaboliti. Studi recenti hanno dimostrato che le HDL possono ridurre il contenuto di colesterolo nelle cellule tumorali, causando una alterazione globale dell'omeostasi del colesterolo stesso. Inoltre, le HDL riducono la presenza di molecole pro-ossidanti e pro-infiammatorie nel microambiente tumorale, limitano la tolleranza immunitaria e la neoangiogenesi. Infine, le HDL rappresentano una valida opzione per veicolare con maggiore selettività i farmaci antineoplastici verso la massa tumorale, grazie al loro legame con il recettore *scavenger BI*. Poiché le HDL possono influire di per sé sulla proliferazione delle cellule tumorali, i sistemi di veicolazione del farmaco basati su particelle simili alle HDL potrebbero rendere il tumore più sensibile all'azione del farmaco stesso e limitare o rallentare lo sviluppo di resistenza.

Parole chiave: *Lipoproteine ad alta densità, cancro, microambiente tumorale, veicolazione di farmaci.*

alla massa tumorale, ma renderla anche più sensibile all'azione del farmaco e/o ridurre l'insorgenza di resistenza.

Per quanto riguarda i meccanismi alla base dell'effetto antitumorale delle HDL, la maggioranza degli studi si è focalizzata sulla modulazione dell'omeostasi del colesterolo. Studi ulteriori sono necessari per indagare l'eventuale effetto delle HDL su altre vie metaboliche, come suggerito dall'inibizione della sintesi della serina. Come descritto in precedenza, le alterazioni metaboliche riscontrate nelle cellule tumorali sono numerose e l'impatto delle HDL su tali alterazioni è pressoché ignoto, come ad esempio il metabolismo degli acidi grassi o l'omeostasi mitocondriale. Inoltre, le HDL potrebbero modulare l'attività di altre componenti cellulari del TME oltre alle popolazioni di cellule immunitarie ad oggi studiate.

Bibliografia

- Franceschini G, Maderna P, Sirtori CR. Reverse cholesterol transport: physiology and pharmacology. *Atherosclerosis*. 1991; 88: 99-107.
- Calabresi L, Gomasaschi M, Rossoni G, Franceschini G. Synthetic high density lipoproteins for the treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Ther.* 2006; 111: 836-854.
- Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: S189-S194.
- Xu S, Laccotripe M, Huang X, et al. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *Journal of Lipid Research*. 1997; 38: 1289-1298.
- Calabresi L, Gomasaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 1724-1731.
- Henrich SE, Thaxton CS. An update on synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles for cancer therapy. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2019; 19: 515-528.
- Menard JA, Cerezo-Magana M, Belting M. Functional role of extracellular vesicles and lipoproteins in the tumour microenvironment. *Philos. Trans.R.Soc.Lond B Biol. Sci.* 2018; 373.
- Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J. Physiol.* 2021; 599: 1745-1757.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12: 685-698.
- Matsushita Y, Nakagawa H, Koike K. Lipid Metabolism in Oncology: Why It Matters, How to Research, and How to Treat. *Cancers (Basel)*. 2021; 13.
- Gomasaschi M. Role of Lipoproteins in the Microenvironment of Hormone-Dependent Cancers. *Trends Endocrinol. Metab.* 2020; 31: 256-268.
- Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* 2020, 31: 62-76.
- Nelson ER, Chang CY, McDonnell DP. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends Endocrinol.Metab.* 2014; 25: 649-655.
- Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* 2020; 30: R921-R925.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883-899.
- Balzan S, Lubrano V. LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. *Life Sci.* 2018; 198: 79-86.
- Pirro M, Ricciuti B, Rader DJ, et al. High density lipoprotein cholesterol and cancer: Marker or causative? *Prog. Lipid Res.* 2018; 71: 54-69.
- Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 12343-12348.
- Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, et al. Metabolic syndrome, plasma lipid, lipoprotein and glucose levels, and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr. Relat Cancer.* 2007; 14: 755-767.
- van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Calligaro M, et al. Blood lipid and lipoprotein concentrations and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Gut.* 2011; 60: 1094-1102.
- Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, et al. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18: 2814-2821.
- Chandler PD, Song Y, Lin J, et al. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 2016; 103: 1397-1407.
- Pedersen KM, Çolak Y, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Low high-density lipoprotein and in-

- creased risk of several cancers: 2 population-based cohort studies including 116,728 individuals. *J. Hematol. Oncol.* 2020; 13: 129.
24. Johnson KE, Siewert KM, Klarin D, et al. The relationship between circulating lipids and breast cancer risk: A Mendelian randomization study. *Plos. Med.* 2020; 17: e1003302.
 25. Kho PF, Amant F, Annibali D, et al. Mendelian randomization analyses suggest a role for cholesterol in the development of endometrial cancer. *Int. J. Cancer.* 2021; 148: 307-319.
 26. Bull CJ, Bonilla C, Holly JM, et al. Blood lipids and prostate cancer: a Mendelian randomization analysis. *Cancer Med.* 2016; 5: 1125-1136.
 27. Zhou P, Li B, Liu B, et al. Prognostic role of serum total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in cancer survivors: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2018; 477: 94-104.
 28. Shi H, Huang H, Pu J, et al. Decreased pretherapy serum apolipoprotein A-I is associated with extent of metastasis and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Onco.Targets.Ther.* 2018; 11: 6995-7003.
 29. Jiang R, Yang ZH, Luo DH, et al. Elevated apolipoprotein A-I levels are associated with favorable prognosis in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Med. Oncol.* 2014; 31: 80.
 30. Lofterod T, Mortensen ES, Nalwoga H et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC. Cancer.* 2018; 18: 654.
 31. Zamanian-Daryoush M, Lindner D, Tallant TC, et al. The Cardioprotective Protein Apolipoprotein A1 Promotes Potent Anti-tumorigenic Effects. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 21237-21252.
 32. Su F, Kozak KR, Imaizumi S, et al. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107: 19997-20002.
 33. Cedo L, García-León A, Baila-Rueda L, et al. ApoA-I mimetic administration, but not increased apoA-I-containing HDL, inhibits tumour growth in a mouse model of inherited breast cancer. *Sci. Rep.* 2016; 6: 36387.
 34. Traugher CA, Opoku E, Brubaker G, et al. Uptake of high-density lipoprotein by scavenger receptor class B type 1 is associated with prostate cancer proliferation and tumor progression in mice. *J. Biol. Chem.* 2020; 295: 8252-8261.
 35. Zamanian-Daryoush M, Lindner DJ, Buffa J, et al. Apolipoprotein A-I anti-tumor activity targets cancer cell metabolism. *Oncotarget.* 2020; 11: 1777-1796.
 36. Kim J, Thompson B, Han S, et al. Uptake of HDL-cholesterol contributes to lipid accumulation in clear cell renal cell carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2019; 1864: 158525.
 37. Hadi T, Ramseyer C, Gautier T, et al., Lipoproteins LDL versus HDL as nanocarriers to target either cancer cells or macrophages. *JCI. Insight.* 2020; 5.
 38. Ossoli A, Pavanello C, Giorgio E, et al. Dysfunctional HDL as a Therapeutic Target for Atherosclerosis Prevention. *Curr. Med. Chem.* 2019; 26: 1610-1630.
 39. Pan B, Ren H, Ma Y et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus elevates the capability of promoting migration and invasion of breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 2012; 131: 70-82.
 40. Ruscica M, Botta M, Ferri N, et al. High Density Lipoproteins Inhibit Oxidative Stress-Induced Prostate Cancer Cell Proliferation. *Sci. Rep.* 2018; 8: 2236.
 41. Plebanek MP, Bhaumik D, Bryce PJ, Thaxton CS. Scavenger Receptor Type B1 and Lipoprotein Nanoparticle Inhibit Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Mol. Cancer Ther.* 2018; 17: 686-697.
 42. Raut S, Mooberry L, Sabnis N, et al. Reconstituted HDL: Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1154.
 43. Wang J, Jia J, Liu J, et al. Tumor targeting effects of a novel modified paclitaxel-loaded discoidal mimic high density lipoproteins. *Drug Deliv.* 2013; 20: 356-363.
 44. McConathy WJ, Nair MP, Paranjape S, et al. Evaluation of synthetic/reconstituted high-density lipoproteins as delivery vehicles for paclitaxel. *Anticancer Drugs.* 2008; 19: 183-188.
 45. Zhang F, Wang X, Xu X, et al. Reconstituted high density lipoprotein mediated targeted co-delivery of HZ08 and paclitaxel enhances the efficacy of paclitaxel in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Eur. J. Pharm.Sci.* 2016; 92: 11-21.
 46. Priem B, van Leent MMT, Teunissen AJP et al. Trained Immunity-Promoting Nanobiologic Therapy Suppresses Tumor Growth and Potentiates Checkpoint Inhibition. *Cell.* 2020; 183: 786-801.
 47. Kadiyala P, Li D, Nuñez FM, et al. High-Density Lipoprotein-Mimicking Nanodiscs for Chemo-immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. *ACS Nano.* 2019; 13: 1365-1384.
 48. Gupta A, Sharma R, Kuche K, Jain S. Exploring the therapeutic potential of the bioinspired reconstituted high density lipoprotein nanostructures. *Int. J. Pharm.* 2021; 596: 120272.