

Articolo

Cannabinoide neuronale CB₁ recettori sopprimono la crescita delle metastasi cerebrali del melanoma inibendo Segnalazione glutamatergica

Carlos Costas-Insua^{1,†}, Marta Seijo-Vila^{2,†}, Cristina Blázquez¹, Sandra Blasco-Benito², Francisco Javier Rodríguez-Baena³, Giovanni Marsicano⁴, Eduardo Pérez-Gómez², Cristina Sánchez-Laorden³, Manuel Guzmán^{1,*}

- ¹ Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica (IUN), Universidad Complutense de Madrid, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 28040 Madrid, Spagna; cacostas@ucm.es (CC-I.); cblazque@ucm.es (CB) Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica (IUN), Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), 28040 Madrid, Spagna; marseijo@ucm.es (MS-V.); s.blasco@ucm.es (SB-B.); eduperez@ucm.es (EP-G.); cristina.sanchez@quim.ucm.es (CS)
- ² Instituto de Neurociencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e Universidad Miguel Hernández (UMH), 03550 San Juan de Alicante, Spagna; francisco.rodriguez@umh.es (FJR-B.); berta.lopez@umh.es (BS-L.)
- ³ Fisiopatología de la plasticidad Neuronal, NeuroCentre Magendie, U1215 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Bordeaux Neurocampus, Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, Francia; giovanni.marsicano@inserm.fr
- * Corrispondenza: mguzman@quim.ucm.es; Tel.: +34-913944668 † Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.



Citazione: Costas-Insua, C.; Seijo-Vila, M.; Blázquez, C.; Blasco-Benito, S.; Rodríguez-Baena, F.; Marsicano, G.; Pérez-Gómez, E.; Sánchez, C.; Sánchez-Laorden, B.; Guzmán, M. Cannabinoide neuronale CB₁

I recettori sopprimono la crescita delle metastasi cerebrali del melanoma inibendo la segnalazione glutamatergica. *tumori* **2023**, *15*, 2439. <https://doi.org/10.3390/cancers15092439>

Redattore accademico: Sanjay K. Srivastava

Ricevuto: 24 marzo 2023
Revisionato: 19 aprile 2023
Accettato: 22 aprile 2023
Pubblicato: 24 aprile 2023



Copyright: © 2023 degli autori. Licenziario MDPI, Basilea, Svizzera. Questo articolo è un articolo open access distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribuzione (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Riepilogo semplice: Si stima che il 60% dei pazienti affetti da melanoma sviluppi metastasi cerebrali da melanoma (MBM). Tuttavia, i fattori molecolari che regolano la crescita delle MBM sono ancora sconosciuti. È stato dimostrato che il neurotrasmettitore eccitatorio glutammato controlla la proliferazione di vari tipi di cellule tumorali all'interno del parenchima cerebrale, ma le fonti cellulari e i meccanismi molecolari coinvolti in questo processo rimangono poco chiari. Grazie al loro noto ruolo nell'inibizione del rilascio sinaptico di glutammato, i cannabinoidi CB₁ recettori (CB₁ recettori Rs) localizzati sui terminali nervosi glutamatergici sono presumibilmente ben posizionati per controllare la crescita dei MBM. Il data mining in silico negli atlanti del genoma tumorale e gli studi in vitro con linee cellulari di melanoma hanno supportato l'ipotesi che un asse recettore glutammato-NMDA guidi la proliferazione delle cellule di melanoma. Sorprendentemente, l'innesto di cellule di melanoma nel cervello di topi privi di CB₁Rs selettivamente nei neuroni glutamatergici hanno aumentato le dimensioni del tumore e contemporaneamente attivato i recettori NMDA sulle cellule tumorali. Nel complesso, i nostri risultati rivelano un ruolo senza precedenti del CB neuronale 1Rs nel controllo delle MBM.

Astratto: Il melanoma è una delle forme di cancro più letali. La maggior parte dei decessi per melanoma è causata da metastasi a distanza in diversi organi, in particolare il cervello, le cosiddette metastasi cerebrali da melanoma (MBM). Tuttavia, i meccanismi precisi che sostengono la crescita delle MBM rimangono poco chiari. Recentemente, il neurotrasmettitore eccitatorio glutammato è stato proposto come segnale pro-tumorigenico specifico del cervello per vari tipi di cancro, ma il modo in cui il glutammato neuronale si sposta verso le metastasi rimane sconosciuto. In questo articolo, dimostriamo che il cannabinoide CB₁ recettore (CB₁ 1R), un regolatore principale della produzione di glutammato dalle terminazioni nervose, controlla la proliferazione del MBM. In primo luogo, l'analisi trascrittomiche in silico degli atlanti del genoma tumorale ha indicato un'espressione aberrante dei recettori del glutammato in campioni di melanoma metastatico umano. In secondo luogo, esperimenti in vitro condotti su tre diverse linee cellulari di melanoma hanno mostrato che il blocco selettivo dei recettori NMDA glutamatergici, ma non dei recettori AMPA o metabotropici, riduce la proliferazione cellulare. In terzo luogo, l'innesto in vivo di cellule di melanoma nel cervello di topi selettivamente privi di CB₁Rs nei neuroni glutamatergici hanno aumentato la proliferazione delle cellule tumorali in concomitanza con l'attivazione del recettore NMDA, mentre la crescita delle cellule del melanoma in altre sedi tissutali

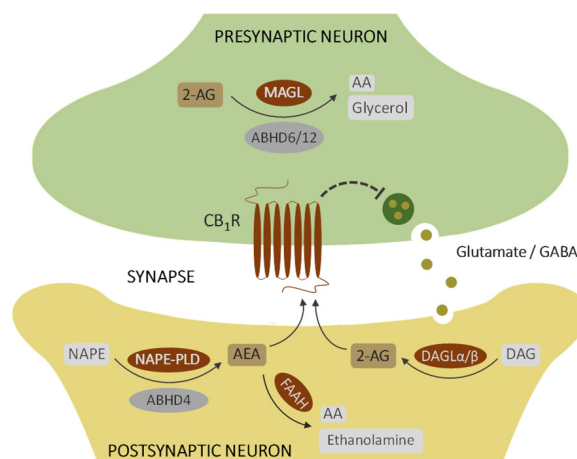
non è stato influenzato. Nel complesso, i nostri risultati dimostrano un ruolo regolatore senza precedenti del CB neuronale₁Rs nel microambiente tumorale del MBM.

Parole chiave: recettore dei cannabinoidi; sistema endocannabinoide; melanoma; metastasi cerebrali; glutammato; recettore NMDA; proliferazione cellulare

1. Introduzione

Il melanoma cutaneo, che rappresenta l'1,7% dei casi di tutti i tumori maligni primari di nuova diagnosi, è una delle forme di tumore più aggressive, determinando lo 0,7% di tutti i decessi per cancro [1,2]. L'avvento di nuove opzioni cliniche per il trattamento del melanoma, come BRAF^{V600E}, MEK e gli inibitori dei checkpoint immunitari hanno contribuito notevolmente a ridurre il tasso di mortalità dei pazienti, in particolare quelli con melanoma avanzato non resecabile o metastatico, che oggi sperimentano un controllo della malattia a lungo termine [3,4]. Nonostante questi traguardi, quasi la metà di questi individui alla fine sviluppa metastasi cerebrali da melanoma (MBM), un processo che causa la morte del 60-70% dei pazienti affetti da melanoma [3]. Pertanto, il melanoma è un tipo di cancro con la maggiore morbilità e mortalità quando si tratta di metastasi cerebrali [5,6], in parte a causa delle limitate opzioni terapeutiche per la sua gestione [7,8], che si traduce in un tasso di sopravvivenza estremamente basso (meno del 10% dei pazienti che superano i 3 anni). Pertanto, l'identificazione dei meccanismi molecolari che influenzano l'MBM rimane una questione aperta di fondamentale importanza per svelare nuovi potenziali bersagli terapeutici per questa malattia devastante.

Il sistema endocannabinoide (ECS; Schema 1) è un sistema di comunicazione intercellulare ampiamente diffuso e altamente espresso nel cervello. È composto da due recettori accoppiati a proteine G (GPCR), ovvero il recettore dei cannabinoidi di tipo 1 (CB₁R) e recettore dei cannabinoidi di tipo 2 (CB₂R); i loro ligandi endogeni (i cosiddetti "endocannabinoidi"), vale a dire i lipidi eicosanoidi *N*-arachidonoiletanolamina (anandamide, AEA) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG); e gli enzimi coinvolti nella sintesi degli endocannabinoidi (per lo più *N*-acil-fosfatidil etanolamina fosfolipasi D (NAPE-PLD) per AEA e diacilglicerolo lipasi α/β (DAGL α/β) per 2-AG) e degradazione (principalmente idrolasi dell'amide degli acidi grassi (FAAH) per AEA e monoacilglicerolo lipasi (MAGL) per 2-AG) [9].



Schema 1. Il sistema endocannabinoide. Fumetto che illustra i principali elementi del sistema endocannabinoide nel cervello. La funzione sinaptica degli endocannabinoidi (AEA e 2-AG) e le proteine coinvolte nella loro segnalazione (CB₁R), sintesi (NAPE-PLD, DAGL α/β , ABHD4) e degradazione (FAAH, MAGL, ABHD6, ABHD12) sono riepilogate (vedere abbreviazioni e ulteriori informazioni nel testo). Altre abbreviazioni: AA, acido arachidonico; DAG, diacilglicerolo; GABA, acido γ -amminobutirrico; NAPE, *N*-acil-fosfatidiletanolamina. Notare che CB₂R non è incluso nello schema perché la sua espressione è essenzialmente limitata alle cellule microgliali.

Una sostanziale ricerca preclinica condotta su modelli murini ha implicato l'ECS nel controllo della crescita e della diffusione di molti tipi di cellule cancerose, tra cui, tra gli altri, glioblastoma, carcinoma polmonare, carcinoma cutaneo, carcinoma epatocellulare, carcinoma mammario, carcinoma prostatico, carcinoma pancreatico, carcinoma coloretale, carcinoma della testa e del collo, colangiocarcinoma, epiteloma tiroideo, rhabdomyosarcoma, linfoma e, più rilevante per il presente studio, cellule di melanoma [10–12]. Tuttavia, la grande maggioranza di questi studi ha mirato a manipolare farmacologicamente l'ECS espresso dalla cellula tumorale, tralasciando l'ECS nelle cellule non tumorali, trascurando così un probabile importante sito di azione fisiopatologica di questo sistema. Da notare, CB1R è uno dei GPCR più abbondanti nel cervello del topo e dell'uomo, mentre CB2R è scarsamente espresso in questo organo, essendo in gran parte limitato alle cellule microgliali [13,14]. L'azione neurobiologica più consolidata del CB1R è l'inibizione retrograda dell'attività sinaptica attraverso la riduzione del rilascio di neurotrasmettitori presinaptici. Ciò si verifica in numerose popolazioni neuronali, inclusi i neuroni GABAergici (inibitori) e i neuroni glutamatergici (eccitatori), rendendo così CB1R una piattaforma chiave di segnalazione omeostatica per la funzione cerebrale [15].

Prove recenti evidenziano l'importanza delle cellule residenti nel cervello per la formazione, lo sviluppo e la progressione delle metastasi cerebrali da diversi tipi di cancro [16]. Nello specifico, le cellule MBM, attraverso la secrezione di beta amiloide, inducono un fenotipo prometastatico e antinfiammatorio negli astrociti [17,18], e altre cellule cancerose, come quelle dei carcinomi al seno e al polmone, utilizzano giunzioni comunicanti per costringere gli astrociti a secernere segnali protumorigenici [19]. Si sa meno sul ruolo dei neuroni nel microambiente delle cellule metastatiche. Recentemente, è stato scoperto che le cellule del carcinoma mammario metastatico stabiliscono contatti sinaptici con i neuroni per cooptare il glutammato secreto dai neuroni. Questo glutammato si lega ai recettori metil-D-aspartato (NMDAR) sulla cellula cancerosa bersaglio, alimentando così un asse di segnalazione oncogenica guidato da NMDAR che garantisce la crescita del tumore [20]. Un processo simile avviene nelle cellule del glioma, dove l'attività neuronale glutamatergica ne promuove la proliferazione [21–23]. Tuttavia, i meccanismi che regolano l'uscita del glutammato pro-tumorigenico dai neuroni alle cellule tumorali, comprese le cellule MBM, sono attualmente sconosciuti.

In questo studio, analizzando in silico le variazioni di espressione degli elementi ECS da campioni di melanoma primario a campioni di melanoma metastatico, abbiamo notato che si verificano anche profondi cambiamenti nel profilo di espressione dei recettori del glutammato. Questo ci ha spinto a condurre studi meccanicistici su cellule di melanoma in vitro, che hanno rivelato che i recettori NMDAR guidano la proliferazione delle cellule di melanoma, suggerendo che il glutammato potrebbe aumentare la diffusione del MBM. Poiché è ben noto che il CB1Gli R inibisce la secrezione di glutammato dai terminali nervosi, abbiamo eseguito vari approcci di allotrapianto basati su cellule di melanoma in topi geneticamente modificati e immunocompetenti privi di CB1Rs selettivamente nei neuroni glutamatergici o GABAergici. Questi esperimenti hanno dimostrato che CB1Le proteine R localizzate sui neuroni glutamatergici, ma non sui neuroni GABAergici, svolgono un ruolo importante nel limitare la crescita delle cellule MBM in vivo. In sintesi, questo studio svela un meccanismo molecolare senza precedenti per spiegare come il rilascio di glutammato dai neuroni sia controllato per sostenere la crescita delle cellule tumorali cerebrali.

2. Materiali e metodi

2.1. Interrogazione dei set di dati sul melanoma GDC-TCGA

Abbiamo avuto accesso ai dati del GDC-TCGA SKCM utilizzando Xena [24]. L'espressione dell'mRNA dei geni selezionati, calcolata come frammenti letti per milione di kilobase (FPKM) tramite sequenziamento ad alto rendimento, è stata ottenuta per tutti i campioni e poi rappresentata graficamente come tumore primario o metastatico, in base alla corrispondente fonte del campione, filtrando i numeri di accesso dei pazienti tramite le parole chiave "tumore primario" o "metastatico". Infine, i campioni di tumore primario sono stati impostati al 100%, i campioni metastatici sono stati calcolati proporzionalmente e i confronti sono stati effettuati tramite un'analisi di Student non appaiata. t -test con la correzione di Welch.

Curve di sopravvivenza per *GRIN3A* l'espressione è stata calcolata con lo stesso set di dati. I gruppi sono stati divisi in quartili e il 25% dei campioni con espressione più elevata è stato definito come l'alto *GRIN3A* gruppo, mentre il resto è stato classificato come basso *GRIN3A* confronti sono stati effettuati mediante un test log-rank (Mantel-Cox).

2.2. Cellule

Le linee cellulari di melanoma B16.F10 e YUMM1.7 sono state ottenute da ATCC (rispettivamente CRL-6475 e CRL-3362) e mantenute in DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, #D5796) integrato con il 10% di FBS e l'1% di penicillina-streptomicina. La linea cellulare di melanoma 1014 è stata gentilmente fornita dal Dott. Lionel Larue (Institut Curie, Parigi, Francia) [25] e mantenute in terreno di coltura F12 (Sigma-Aldrich, #N6658) integrato con il 10% di FBS e penicillina-streptomicina. Le cellule sono state testate per la contaminazione da micoplasma ogni due settimane mediante PCR.

2.3. PCR quantitativa

L'RNA è stato isolato con il kit di purificazione dell'RNA monofase NucleoZOL (Macherey-Nagel #740404.200) seguendo le istruzioni del produttore. Una quantità di 2 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando il kit di sintesi cDNA Transcriptor First Strand (Roche Life Science, Penzberg, Alta Baviera, Germania, n. 04379012001) con primer esamERICI casuali. La RT-PCR quantitativa in tempo reale (Q-PCR) è stata eseguita in un sistema QuantStudio 7/12k Flex (Applied Biosystems) utilizzando il LightCycler® Multiplex DNA Master (Roche Life Science #07339577001) e SYBR green (Roche Life Science #4913914001). I primer utilizzati sono elencati nella Tabella 1.

Tabella 1. Elenco dei primer utilizzati per gli esperimenti qPCR.

Gene	Primer avanzato (5'→3')	Primer inverso (5'→3')
<i>GRIA1</i>	ACCACTACATCCTCGCCAAC	TCACTTGTCTCCACTGCTG
<i>GRIA2</i>	ATTCTGCATGCTCCACCTA	TTCTAAACTTGCTTTTCAGGCTAT
<i>GRIA3</i>	AGCGTTGTGATACGATGAAA	CAAGGTTTACAGGCGGTCCT
<i>GRIA4</i>	CTGCCAACAGTTTGTCTGTG	AAATGGCAAACACCCCTCTA
<i>GRIN1</i>	GCTTTTGACGCCCCTGAAC	GGGCCTCTGCTCTACCACTCTT
<i>GRIN2A</i>	ATTCAACCAGAGGGGGCGTA	TTCAAGACAGCTGCGTCATAG
<i>GRIN2B</i>	CTTCCTCCTTGCTTCCACTT	GGTGAGAAAAGCCAACCTGA
<i>GRIN2C</i>	AGTTCCGGGGGACAGACAAG	TCTCATGGGGCCAGAATTTCAA
<i>GRIN2D</i>	TGCGATACAACCAGCCAAG	AGATGAAGGCGTCCAGTTTC
<i>GRM1</i>	GCCCAATGCAGAGCTCAC	GTCACCTCACTCGAGGTAACG
<i>GRM2</i>	GATGTCTCCATCCAGGTGGC	AGCCTACCTTCTGGTAGCGA
<i>GRM8</i>	CTGATATGGAGCTGCGGGT	CATGGGGGAAGGCTTTAGGG
<i>DLG4</i>	GCCAATTCTCCCCCTGTGAT	CGTTCACCTGCAACTCATATCC
<i>DLGAP1</i>	CAGCACACACTCCAACCTGCC	CAACAGCAATCGCAGTCCG

2.4. Saggi di vitalità cellulare

Per tutte e tre le linee cellulari, 6000 cellule per pozzetto sono state seminate su una piastra da 48 pozzetti in un terreno contenente il 10% di FBS. Il giorno successivo, sono state preparate diluizioni seriali di MK-801 (Sigma-Aldrich, n. M107 disciolto in DMSO), NBQX (Tocris, n. 1044 Bristol, Regno Unito, disciolto in acqua) e LY341495 (Tocris, n. 1209 disciolto in DMSO) e aggiunte direttamente alle concentrazioni indicate in triplicato. La quantità di veicolo è rimasta costante tra i pozzetti e sono state eseguite incubazioni in triplicato anche con il solo veicolo. Quarantotto ore dopo, è stato aggiunto il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Panreac AppliChem, Chicago, IL, USA, # A2231) è stato aggiunto per 4 ore, il terreno è stato successivamente aspirato e l'OD a 470 nm è stato misurato dopo l'aggiunta di 100 µL di isopropanolo acido per pozzetto utilizzando un lettore di micropiastre Rayto RT-6100. La vitalità è stata calcolata come media di tre-cinque esperimenti indipendenti relativi alle condizioni del veicolo e i confronti statistici sono stati effettuati mediante un'analisi della varianza a un fattore con il test post-hoc di Dunnett.

2.5. Immunofluorescenza

Per tutte e tre le linee cellulari, 20.000 cellule per pozzetto sono state seminate su coprioggetto precedentemente rivestiti con poli-L-lisina (10µg/mL, Sigma-Aldrich, #P9155 a 10µg/mL di concentrazione) e posizionate in una piastra da 24 pozzetti. Il giorno successivo, è stato aggiunto MK-801 (sciolto in DMSO) o il suo veicolo corrispondente a una concentrazione finale di 0,4 mM. Ventiquattro ore dopo, le cellule sono state lavate due volte con PBS, fissate con formalina al 10% (Panreac AppliChem, n. 143091.1214) a temperatura ambiente (TA) per 10 minuti, nuovamente lavate due volte con PBS e conservate in frigorifero.

Per immunodetect Ki67, gli antigeni sono stati prima recuperati incubando i campioni con tampone citrato (pH 6,0) per 20 minuti a 65°C, e quindi permeabilizzato e bloccato in PBS contenente 0,25% Triton X-100 (PBS-TX) e 10% siero di capra (Abcam, Cambridge, Regno Unito, # ab7481) per 1 ora a temperatura ambiente. Un anticorpo contro Ki67 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, # 550609) è stato diluito (1:500) direttamente nel tampone di blocco e incubato durante la notte a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS-TX per 10 minuti, i campioni sono stati successivamente incubati per 1,5 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti-topo AlexaFluor 488 altamente cross-adsorbito appropriato (1:500; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA #A-11001), insieme a DAPI (Roche, Basilea, Svizzera, #10236276001) per visualizzare i nuclei. Dopo 3 lavaggi in PBS, le sezioni sono state montate su vetrini da microscopio utilizzando Mowiol.®Mezzo di montaggio. I campioni sono stati analizzati con un microscopio confocale Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) ed elaborati con il software ImageJ (NIH, Bethesda, WA, USA). In tutti i casi, sono stati quantificati tre replicati biologici, ciascuno composto da sei campi indipendenti. I dati sono presentati come percentuale di cellule positive per Ki67 divisa per il numero totale di cellule nel campo, e i confronti statistici sono stati effettuati mediante un test di Student non appaiato. *t*-test. Immagini rappresentative per ciascuna condizione sono state preparate per la presentazione delle figure applicando regolazioni di luminosità e contrasto in modo uniforme utilizzando ImageJ.

Per i campioni tumorali (vedi sotto), i topi sono stati perfusi per via transcardiaca con PBS seguito da una soluzione di paraformaldeide al 4%. I cervelli sono stati dissezionati e post-fissati per una notte nella stessa soluzione, crioprotetti con saccarosio e montati su criostampo standard con composto OCT. Sezioni coronali seriali (30µm-thick) attraverso l'intero tumore sono stati raccolti in soluzione crioprotettiva come sezioni galleggianti libere e conservati a -20°C. Le fette sono state permeabilizzate e bloccate in PBS contenente lo 0,25% di Triton X-100 e il 10% di siero di capra (Pierce Biotechnology) per 1 ora a temperatura ambiente. Per il rilevamento del PCNA, gli antigeni sono stati recuperati mediante incubazione con tampone citrato (pH 6,0) a 95°C per 20 minuti prima della fase di blocco. Gli anticorpi primari sono stati diluiti direttamente nel tampone di blocco e i campioni sono stati incubati per una notte a 4°C con le seguenti diluizioni: anti-PCNA (1:250, Abcam, #ab-29), anti-PSD-95 (1:250, Abcam, #ab18258). Dopo 3 lavaggi con PBS-TX per 10 minuti ciascuno, i campioni sono stati successivamente incubati per 1,5 ore a temperatura ambiente con gli appropriati anticorpi secondari altamente cross-adsorbiti anti-topo, cavia o coniglio AlexaFluor 488 e Alexa Fluor 594 (1:500, tutti di Invitrogen) insieme a DAPI (Roche, Basilea, Svizzera) per visualizzare i nuclei. Dopo 3 lavaggi in PBS, le sezioni sono state montate su vetrini da microscopio utilizzando Mowiol.®Mezzo di montaggio. Le immagini di fluorescenza confocale sono state acquisite utilizzando il software LAS-X con un microscopio confocale SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germania). Tutte le quantificazioni sono state ottenute da un minimo di 3 sezioni per animale e sono stati inclusi almeno 6 animali per gruppo (come indicato nella legenda corrispondente). Le immagini sono state acquisite utilizzando un obiettivo apocromatico a immersione in olio 40X e un foro stenopeico standard (1 disco di Airy). L'area immunoreattiva è stata misurata utilizzando il software open source FIJI ImageJ, stabilendo una soglia per misurare solo il segnale specifico che è stato mantenuto costante lungo le diverse immagini. Sono stati inclusi controlli per garantire che nessuno degli anticorpi secondari producesse alcun segnale significativo in preparazioni incubate in assenza dei corrispondenti anticorpi primari. Immagini rappresentative per ciascuna condizione sono state preparate per la presentazione in figura applicando uniformemente luminosità, contrasto e altre regolazioni.

2.6. Animali

Le procedure sperimentali sono state eseguite in conformità con le linee guida e l'approvazione dei Comitati per il benessere degli animali dell'Universidad Complutense de Madrid e

Comunidad de Madrid, CSIC e Generalitat Valenciana, seguendo le direttive del Governo spagnolo e della Commissione Europea. L'alloggiamento, la manipolazione e l'assegnazione degli animali ai diversi gruppi sperimentali sono stati condotti come descritto in precedenza [26]. Sono state adottate misure adeguate per ridurre al minimo il dolore e il disagio degli animali. Abbiamo utilizzato CB condizionale $1R^{floxed}/floxed;Nex1-Cre$ (qui di seguito denominato Glu-CB1Topi knockout R-KO), in cui il CB1Gene codificante R (*Cnr1*) è stato eliminato selettivamente dai neuroni glutamatergici del telencefalo dorsale *sensu lato* (compresi neocorteccia, paleocorteccia e archicorteccia) e CB condizionale $1R^{floxed}/floxed;Dlx5/6-Cre$ (qui di seguito denominato GABA-CB1Topi R-KO), in cui *Cnr1* è stato eliminato selettivamente dai neuroni GABAergici del proencefalo [27,28]. *Cnr1* Come controlli sono stati utilizzati animali della stessa cucciolata trattati con fluorochinoloni e privi di ricombinasi Cre. Abbiamo utilizzato animali di entrambi i sessi (con un rapporto approssimativo di 1:1), rappresentati in modo differenziale nei rispettivi dot plot, e abbiamo scartato gli effetti sesso-specifici mediante analisi statistiche indipendenti.

2.7. Alloinnesti tumorali

Per gli alloinnesti sottocutanei, 2 milioni di 1014 cellule risospese in 100 μ L di PBS sono stati iniettati per via sottocutanea nel fianco destro di Glu-CB adulto (2-4 mesi) $1R$ -KO e compagni di cucciolata di controllo di entrambi i sessi. I tumori sono stati misurati a giorni alterni con un calibro esterno e il volume è stato calcolato come $0,52 \times (\text{larghezza})^2 \times (\text{lunghezza})$. Gli animali venivano soppressi quando il volume del tumore superava i 1000 mm^3 . I confronti statistici sono stati effettuati da uno studente non accoppiato *t*-test in ogni momento.

Per alloinnesti intracranici, Glu-CB per adulti (2-4 mesi) $1R$ -KO, GABA-CB1R-KO e i topi di controllo di entrambi i sessi sono stati anestetizzati con isoflurano al 4% (Solvat, L'Hospital de Llobregat, Barcellona, Spagna, #ESPT0001), successivamente trattati con una miscela di buprenorfina (0,1 mg/kg) e meloxicam (1 mg/kg) e inseriti in un apparecchio stereotassico (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Ai topi sono state iniettate 25.000 cellule 1014 risospese in 2 μ L di PBS con una microsiringa Hamilton (Sigma-Aldrich # HAM7635-01) accoppiato ad un ago da 30 g controllato da una pompa (World Precision Instruments, # SYS-Micro4) direttamente nello striato dorsale destro (2 μ L ad un tasso di 1 μ L/min) con le seguenti coordinate (in mm dal bregma): antero-posteriore: +1,00 mm, dorso-ventrale: -2,50 mm, mediale-laterale: +2,00 mm. Dopo ogni iniezione, la siringa è rimasta in posizione per 5 minuti prima di essere rimossa. Dopo l'intervento chirurgico, i topi sono stati monitorati quotidianamente e gli animali che non hanno recuperato il peso corporeo pre-operatorio sono stati soppressi e non inclusi nell'esperimento.

2.8. Risonanza magnetica per immagini (RMI)

Gli studi di risonanza magnetica per immagini (RMI) sono stati eseguiti presso BioImaC (ICTS BioImagen Complutense), nodo dell'ICTS ReDIB (<https://www.redib.net/>, consultato il 18 aprile 2023), utilizzando uno scanner MRI da banco da 1 Tesla (ICON 1T-MRI; Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germania). Il sistema è costituito da un magnete permanente da 1 T con un sistema di gradiente in grado di fornire un'intensità di gradiente di 450 mT/m. È stata utilizzata una bobina RF a solenoide per la testa di topo. Gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano al 2% (IsoFlo, Zoetis, NJ, USA). Uno studio MRI longitudinale per valutare e quantificare l'evoluzione del tumore è stato eseguito 12 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali. Le immagini post-contrasto sono state acquisite contemporaneamente (~15 min) dopo l'iniezione intraperitoneale di 0,1 mL di Gd-BOPTA (MultiHance®, Gd-BOPTA; Bracco Imaging SpA, Milano, Italia). Pre e post contrasto di routine (MultiHance®) Sono stati acquisiti studi di risonanza magnetica per garantire le variazioni di contrasto dovute all'agente di contrasto a base di gadolinio.

I dati MRI sono stati acquisiti utilizzando il pacchetto software Paravision 6.0.1 (Bruker, BioSpin). Il protocollo MRI principale consisteva in un esperimento bidimensionale pesato in T1 (T1WI) e un esperimento multiecho di densità protonica (PDWI)/pesato in T2 (T2WI). Le sezioni anatomiche coronali T1WI sono state acquisite utilizzando una sequenza spin echo con un tempo di ripetizione (TR) = 267 ms, tempo di eco (TE) = 6,15 ms, numero di medie (NA) = 30, campo visivo (FOV) = 17. $\times$ 17 millimetri², spessore della fetta = 1 mm e numero di fette = 15. L'acquisizione

la dimensione della matrice era 170×170 (risoluzione 0,100×0,100×1,00 mm) e il tempo di acquisizione totale è stato di ~11 min. L'esperimento PDWI/T2WI è stato acquisito con lo stesso orientamento anatomico utilizzando una sequenza multieco di spin con TR = 2250 ms, TE = 32 e 96 ms, NA = 4, FOV = 17×17 millimetri², spessore della fetta = 1 mm e numero di fette = 15. La dimensione della matrice acquisita era 128×128 (risoluzione 0,132×0,132×1,00 mm) e il tempo di acquisizione totale ~3,5 min.

I dati della risonanza magnetica sono stati analizzati utilizzando il software ImageJ (Rasband W., National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, versione 1.51a). Il volume del tumore è stato calcolato utilizzando il software ImageJ a partire da immagini pesate in T1 e i confronti statistici sono stati effettuati mediante un'analisi statistica di Student non accoppiata. *T*-test.

2.9. Western Blotting

I topi affetti da tumori intracranici sono stati sacrificati 12 giorni dopo l'impianto delle cellule tumorali e i loro cervelli sono stati sezionati. I tumori contenenti melanina (di colore nero) sono stati sezionati sotto una lente d'ingrandimento. Successivamente, i campioni tumorali sono stati omogeneizzati in modo indipendente con l'ausilio di un macinatore automatico (DWK Life Sciences GmbH, Magonza, Germania, n. 749540-0000). Quasi l'intero tumore (~30µg di proteine totali) è stato risolto utilizzando PAGE-SDS seguito dal trasferimento su membrane PVDF con Bio-Rad FastCast® reagenti e linee guida. Le membrane sono state bloccate con BSA al 5% (*iol contro*) in TBS-Tween-20 (0,1%) per 1 ora e incubato durante la notte con i seguenti anticorpi e diluizioni: anti-fosfo-NMDAR2B-Y1252 (1:1000, Thermo Fisher, #48-5200) e anti-α-tubulina (1:10.000, Sigma-Aldrich #T9026). Entrambi gli anticorpi sono stati preparati in TBS Tween-20 (0,1%) con BSA al 5% (*iol contro*). Le membrane sono state quindi lavate tre volte con TBS-Tween-20 (0,1%) e anticorpi secondari marcati con HRP, selezionati in base alla specie di origine degli anticorpi primari (Sigma-Aldrich #NA-931 e #NA-934), sono stati aggiunti per 1 ora a una diluizione 1:5000 in TBS-Tween-20 (0,1%) a temperatura ambiente. Infine, le bande proteiche sono state rilevate mediante incubazione con un reagente a chemiluminescenza potenziata (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Tutti i risultati forniti rappresentano l'analisi densitometrica, eseguita con il software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), della densità ottica della banda fosfo-NMDAR2B-Y1252 rispetto alla densità ottica della banda α-tubulina, e i confronti statistici sono stati effettuati mediante un'analisi di Student non appaiata. *T*-test. Le scansioni non ritagliate di tutti i blot sono mostrate nei Materiali supplementari (Figura S1).

2.10. Iniezione nell'arteria intracarotidea

I topi sono stati anestetizzati con isoflurano, iniettati con buprenorfina (0,1 mg/kg) e adagiati su una superficie di vetro riscaldata sotto uno stereomicroscopio. È stato eseguito un taglio ventrale sul lato sinistro del collo e la pelle e il grasso sono stati retratti per esporre la trachea e il muscolo pettorale dove scorre l'arteria carotide. L'arteria è stata isolata con una pinza sottile, staccandola dal fondo del tessuto e dal nervo vago, che è stato lasciato intatto. Due suture sono state posizionate sotto l'arteria con nodi aperti. Quindi, il ramo esterno superiore dell'arteria è stato isolato e chiuso saldamente con sutura e un pezzo di cotone bagnato posizionato sotto l'arteria carotide comune. La sutura inferiore è stata successivamente chiusa e le cellule sono state iniettate (0,2 milioni 1014 cellule in 100µL di PBS sterile) nell'arteria carotide comune. La sutura superiore è stata chiusa, il cotone è stato rimosso e la ferita è stata pulita e chiusa con punti metallici chirurgici. Infine, agli animali sono stati iniettati 0,5-1,0 ml di soluzione salina per via sottocutanea per prevenire la disidratazione nelle ore successive all'intervento. Gli animali sono stati monitorati nelle ore successive per un corretto recupero. Una settimana dopo, i punti metallici sono stati rimossi.

2.11. Analisi del carico metastatico cerebrale

I topi iniettati con cellule tumorali nell'arteria carotide sono stati sacrificati e i cervelli sono stati raccolti e fissati in PFA al 4% per una notte. Sono stati seguiti da 3 lavaggi con PBS e incubazione in concentrazioni crescenti di saccarosio fino al 30%. *control contro* con ddH₂O. Quindi, i cervelli sono stati tagliati utilizzando un criotomo per ottenere 100-µfette spesse m, conservate in un mezzo di congelamento (30% glicole etilenico, 30% ddH₂O, 30% glicerolo e 10% 10X PBS), e mantenuto a -20°C. Fette

sono stati montati su vetrini con Mowiol. Le sezioni sono state acquisite utilizzando l'Axiocan 7 (Zeiss) con imaging in campo chiaro utilizzando un obiettivo 10X. Le immagini sono state esportate in formato Tiff ad alta qualità e l'area cerebrale totale e l'area metastatica totale sono state quantificate utilizzando il software ImageJ. I confronti statistici sono stati effettuati mediante un modello non appaiato di Student. *t*-test.

2.12. Iniezione nella vena della coda

Glu-CB per adulti (2–4 mesi) 1R-KO e compagni di cucciolata di controllo di entrambi i sessi sono stati introdotti per 5 minuti in un apparecchio Thermacage (Thermo Fisher, #NC1727075) impostato a 37 °C prima dell'intervento chirurgico. Quindi, gli animali sono stati immobilizzati in un contenitore per roditori (Panlab, Barcellona, Spagna #LE5016) e 0,5 milioni di cellule 1014 in 100 µL di PBS sterile sono stati iniettati nella vena laterale della coda utilizzando un ago da 30 g. Tre settimane dopo, i topi sono stati sacrificati e sono stati trattati con cellule nere metastatiche. *fuochi* Nei polmoni sono stati contati manualmente sotto una lente d'ingrandimento. Immagini rappresentative sono state scattate con la fotocamera di un telefono dopo aver fissato e disidratato i polmoni rispettivamente con paraformaldeide al 4% ed etanolo al 70%. I confronti statistici sono stati effettuati da un singolo studente non appaiato. *t*-test.

3. Risultati

3.1. Disregolazione degli elementi ECS e dei recettori del glutammato nelle metastasi del melanoma

L'espressione degli elementi ECS è disregolata in molteplici forme di cancro, incluso il melanoma [29,30]. Per valutare se l'ECS influenza lo sviluppo delle metastasi del melanoma, abbiamo interrogato il set di dati trascrittomici del melanoma cutaneo della pelle (SKCM) GDC-TCGA per l'espressione degli elementi ECS più caratteristici nel tumore primario rispetto alle biopsie metastatiche utilizzando Xena®attrezzo [24]. CB1R (codificato da *CNR1*) e soprattutto CB2R (*CNR2*), così come DAGLα (*DAGLA*), sono stati sovraespressi nei campioni metastatici, mentre DAGLβ (*DAGLB*), FAAH (*FAAH*), e dominio alfa/beta-idrolasi contenente 6 e 12 (*ABHD6*/*ABHD12*)-due enzimi alternativi per l'inattivazione del 2-AG- sono stati sottoregolati (Figura 1). Tutti gli altri membri ECS analizzati sono rimasti inalterati (Figura 1). Nella didascalia completa, questi cambiamenti, sebbene di modesta entità, indicherebbero un tono 2-AG/AEA elevato nel melanoma metastatico dovuto a una maggiore produzione di 2-AG (sovraespressione di DAGLα) e una ridotta bioconversione di 2-AG/AEA (sottoregolazione di ABHD6/12 e FAAH, rispettivamente), in concomitanza con un'elevata disponibilità dei due veri e propri bersagli molecolari 2-AG/AEA, ovvero CB1R e CB2R.

Da notare che la produzione di endocannabinoidi nel cervello avviene tramite Ca²⁺ mobilitazione di G_{trimestre} 11GPCR accoppiati a proteine, in particolare i recettori metabotropici del glutammato 1 e 5 (mGluR1/5) [9]. Inoltre, una segnalazione glutamatergica aberrante è stata precedentemente riscontrata nel melanoma [31,32] e altri tipi di cancro [33,34]. Pertanto, abbiamo analizzato lo stato dei recettori del glutammato. L'espressione di mGluR1 (*GRM1*) e mGluR5 (*GRM5*) è stata conservata dai tumori primari ai campioni metastatici, ma sono stati evidenti cambiamenti moderati per altri recettori come mGluR2/3/7/8 (*GRM2*, *GRM3*, *GRM7*, *EGRM8*) (Figura 2A). Per quanto riguarda le subunità che formano i recettori ionotropici del glutammato, vale a dire N recettori del metil-daspartato (NMDAR) e recettori dell'acido alfa-ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolo-propionico (AMPA), i cambiamenti di espressione erano evidenti anche tra i campioni primari e metastatici (Figura 2B,C). Degno di nota, tra le subunità NMDAR, un aumento della regolazione di NMDAR2B (*GRIN2B*) nelle metastasi è stato il cambiamento più pronunciato (Figura 2B), mentre la sovraespressione di GLUR2 (*GRIA2*) potrebbe essere evidenziato per le subunità AMPAR (Figura 2C). I cambiamenti sono stati evidenti anche per PSD-95 (*DLG4*), ma non per GKAP (*DLGAP1*) o BDNF (*BDNF*), tre proteine a valle degli NMDAR (Figura 2D) [20]. Nel complesso, queste analisi trascrittomiche rivelano una disregolazione (probabilmente una sovraattivazione) della segnalazione glutamatergica nel melanoma metastatico rispetto al melanoma primario.

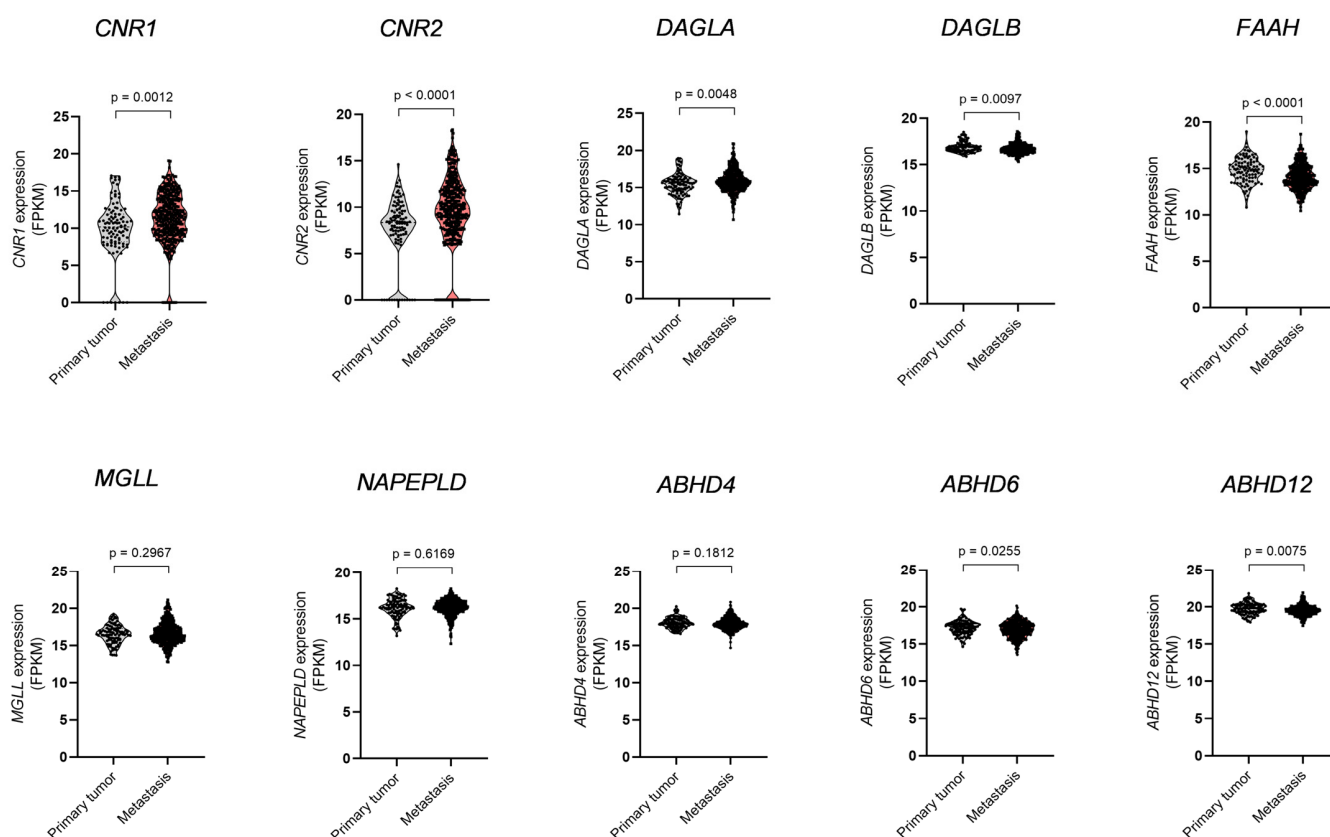


Figura 1. Livelli di mRNA degli elementi ECS nel melanoma primario e metastatico umano. L'espressione del trascritto di *CNR1*(CB₁R), *CNR2*(CB₂R), *DAGLA*(DAGL- α), *DAGLB*(DAGL- β), *FAAH* (FAAH), *MGLL*(MAGL), *NAPEPLD*(NAPE-PLD), *ABHD4*(ABHD4), *ABHD6*(ABHD6), e *ABHD12* (ABHD12) (in FPKM) è stato confrontato tra tumori primari e campioni metastatici di pazienti con melanoma mediante dati di Student non appaiati *t*-test con correzione di Welch. I dati sono stati ottenuti dal set di dati GDC-TCGA SKCM utilizzando Xena e comprendevano 103 campioni di tumore primario e 367 campioni metastatici.

3.2. Il blocco dei recettori NMDAR inibisce la proliferazione delle cellule del melanoma in vitro

Abbiamo poi valutato se le cellule di melanoma esprimono recettori del glutammato e, in tal caso, se questi recettori siano importanti per sostenere la crescita cellulare. A tale scopo, abbiamo impiegato tre diverse linee cellulari di melanoma derivate singenicamente dal ceppo di topi C57BL/6: la linea cellulare YUMM1.7 [35], la linea cellulare 1014 [25], e la linea cellulare B16.F10 [10]. Queste linee cellulari rappresentano in generale due importanti mutazioni genetiche che causano il melanoma, che sono solitamente esclusive sia nelle linee cellulari che nei tumori e sono presenti nel 60-80% dei melanomi [36], vale a dire BRAFV600E/K(YUMM1.7) e NRASQ61R/K/L(1014), mentre B16.F10 contiene forme di tipo selvaggio di entrambe le proteine [37]. Gli esperimenti di PCR quantitativa hanno mostrato che le tre linee cellulari testate esprimono vari sottotipi di mGluR, subunità AMPAR e NMDAR, nonché proteine correlate a NMDAR, come PSD-95 (*DLG4*) e GKAP (*DLGAP1*) (Tavolo2).

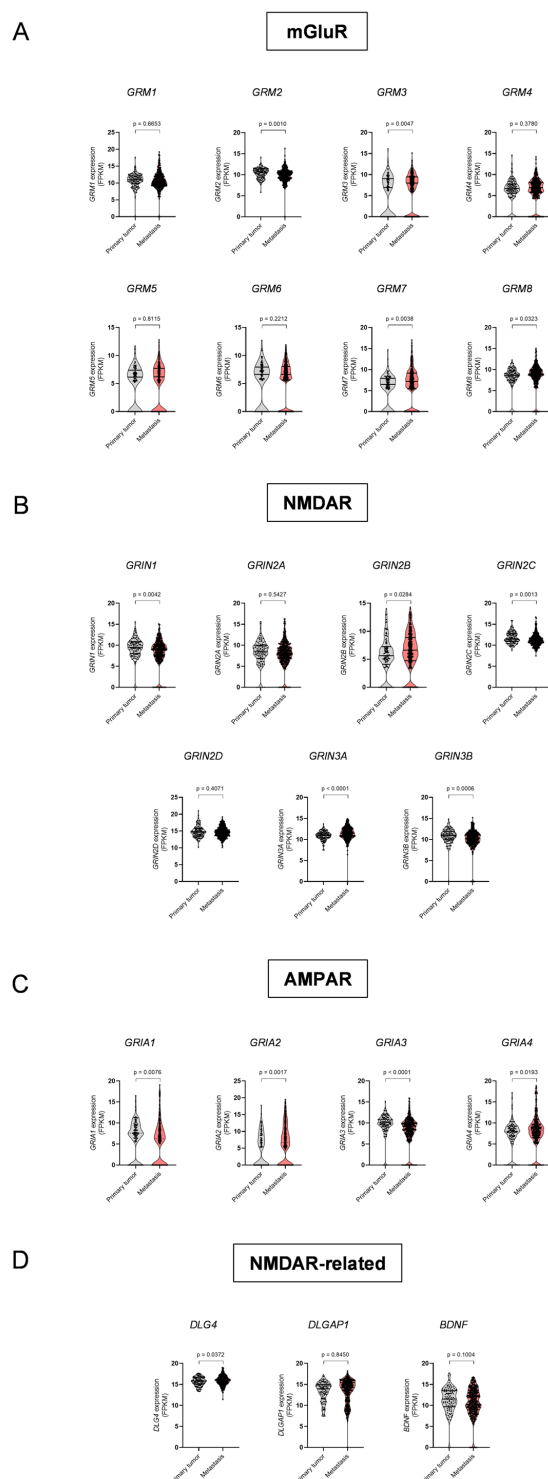


Figura 2. Livelli di mRNA dei recettori del glutammato e delle loro subunità nel melanoma primario e metastatico umano. L'espressione di (**UN**) recettori metabotropici del glutammato 1 (*GRM1*), 2 (*GRM2*), 3 (*GRM3*), 4 (*GRM4*), 5 (*GRM5*), 6 (*GRM6*), 7 (*GRM7*), e 8 (*GRM8*); (**B**) Subunità del recettore NMDA *GRIN1* (NR1), *GRIN2A* (NR2A), *GRIN2B* (NR2B), *GRIN2C* (NR2C), *GRIN2D* (NR2D), *GRIN3A* (NR3A), e *GRIN3B* (NR3B); (**C**) Subunità del recettore AMPA *GRIA1*, *GRIA2*, *GRIA3*, *GRIA4*; E (**D**) Geni correlati al recettore NMDA *DLG4* (PSD-95), *DLGAP1* (GKAP), e *BDNF* (BDNF) è stato confrontato tra tumori primari e campioni metastatici mediante analisi di Student non appaiate *t* test con correzione di Welch. In tutti i casi, i dati (in FPKM) sono stati ottenuti dal set di dati GDC-TCGA SKCM utilizzando Xena e comprendevano 103 campioni di tumore primario e 367 campioni metastatici.

Tabella 2. Livelli di mRNA dei recettori del glutammato e delle loro subunità nelle linee cellulari del melanoma.

Gene	1014	CHE BELLO 1.7	B16.F10
<i>GRIN1</i>	33.29±1.30	31,84±0,02	27.62±0,62
<i>GRIN2A</i>	33.45±1.28	27.78±0,94	ND
<i>GRIN2B</i>	30.01±1.53	28.15±1.41	27.55±1,87
<i>GRIN2C</i>	30.20±1.11	28.77±2.31	29.18±1.12
<i>GRIN2D</i>	32,88±1.48	26.84±1.30	31.00±0,08
<i>GRIA1</i>	34.59±2.41	31.72±1.10	35.40±3.44
<i>GRIA2</i>	30,79±1,87	28.66±1.10	30.17±2.09
<i>GRIA3</i>	ND	ND	ND
<i>GRIA4</i>	24.62±2.57	33.81±1.23	26.86±0,80
<i>GRM1</i>	29.15±1,60	32.41±2.02	30.08±0,58
<i>GRM2</i>	ND	ND	ND
<i>GRM8</i>	37.72±1,88	33.55±2.46	31.31±1.41
<i>DLG4</i>	23.57±2,88	20,98±3.38	25.25±0,31
<i>DLGAP1</i>	34,65±2.12	29,81±8,80	36,86±2.04

Espressione relativa (in Ct) dei recettori del glutammato e delle proteine correlate nelle linee cellulari di melanoma 1014, YUMM1.7 e B16.F10. ND: non rilevato.

Come approccio iniziale per accertare l'importanza della segnalazione glutamatergica nella crescita delle cellule del melanoma, abbiamo condotto test di vitalità cellulare in presenza di (i) LY341495, un mGluR α antagonista [38]; (ii) NBQX, un antagonista selettivo AMPAR, [39]; o (iii) MK-801, un antagonista selettivo NMDAR [40]. Il blocco dei mGluR per 48 ore ha ridotto la vitalità delle cellule YUMM1.7 e B16.F10 solo alla dose più alta testata (Figura 3A). Abbiamo riscontrato un effetto simile inibendo gli AMPAR, con la sola dose più alta che riduce leggermente la vitalità della linea cellulare 1014 (Figura 3B). Al contrario, il blocco farmacologico dei recettori NMDAR ha ridotto in modo marcato e dose-dipendente la vitalità cellulare in tutti i casi (Figura 3C). Per supportare ulteriormente questo effetto, abbiamo trattato le cellule con una dose submassimale di MK-801 (0,4 mM) per 24 ore e abbiamo immunodetettato il marcatore di proliferazione cellulare, Ki67. La percentuale di Ki67+le cellule sono diminuite significativamente dopo la sfida MK-801 (Figura 3D). Nel complesso, questi dati supportano l'ipotesi che i recettori NMDAR promuovano la proliferazione delle cellule del melanoma.

3.3. CB α Le R si situano sui neuroni glutamatergici controllano la crescita del MBM in vivo

Dato il ruolo ben caratterizzato del CB α Rs nel controllo del rilascio di glutammato da parte dei terminali nervosi [15] e i dati sopra menzionati che mostrano che i recettori NMDAR guidano la crescita delle cellule del melanoma in vitro, abbiamo dedotto che il CB neuronale α Gli R potrebbero limitare la crescita delle cellule di melanoma nel cervello attraverso una riduzione del rilascio di glutammato. Per valutare questa ipotesi, abbiamo iniettato 1014 cellule nello striato di topi knockout condizionali privi di CB α Gene R selettivamente nei neuroni glutamatergici/eccitatori corticali (CB α R α floxed/floxed;Nex1-Cre α topi, qui di seguito denominati Glu-CB α Topi R-KO) e abbiamo analizzato la crescita del tumore mediante risonanza magnetica (RM). Questi animali presentano livelli aumentati di glutammato nello striato a causa del CB sopra menzionato. Delezione genetica R, che porta ad un rilascio aumentato di glutammato dai neuroni corticali eccitatori che si proiettano sullo striato [27,41]. Dodici giorni dopo l'impianto, i tumori erano chiaramente visibili e il loro volume era quasi doppio in Glu-CB α Topi R-KO rispetto ai compagni di cucciolata di controllo di tipo selvatico (Figura 4A). Al contrario, alterando il rilascio del neurotrasmettitore inibitorio GABA in seguito all'eliminazione del CB α Gene R selettivamente dai neuroni GABAergici/inibitori del proencefalo [27] (CB α R α floxed/floxed;Dlx5/6-Cre α topi, qui di seguito denominati GABA-CB α I topi R-KO) non hanno causato alcuna alterazione evidente nella crescita del tumore quando si utilizzava la stessa impostazione sperimentale (Figura 4A). Di conseguenza, l'espressione del marcatore di proliferazione cellulare PCNA è aumentata nei tumori innestati in Glu-CB α Animali R-KO

rispetto ai compagni di cucciolata di controllo, mentre questo effetto non è stato osservato in GABA-CB₁Animali R-KO (Figura4B).

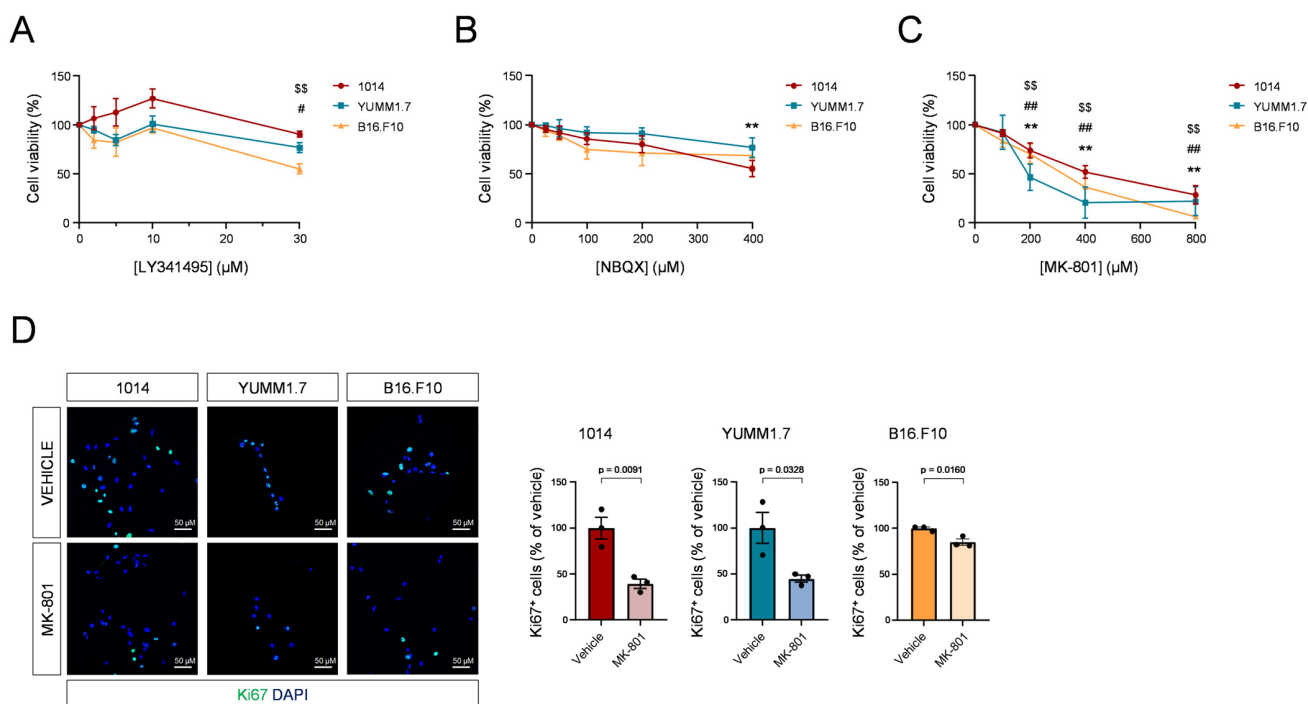


Figura 3. Il blocco dei recettori NMDAR, ma non dei recettori mGluR o degli AMPAR, compromette la crescita delle cellule del melanoma nel topo. **(A).** Percentuale di cellule vitali 1014, YUMM1.7 o B16.F10 dopo l'esposizione al veicolo o 2, 5, 10, 20 o 30 μM dell'antagonista mGluR LY341495 per 48 ore. I confronti sono stati effettuati mediante ANOVA a una via con il test post-hoc di Dunnett. # $P < 0,05$ (linea cellulare YUMM1.7) dalle condizioni del veicolo, \$\$ $P < 0,01$ dalle condizioni del veicolo (linea cellulare B16.F10). **(B).** Percentuale di cellule vitali 1014, YUMM1.7 o B16.F10 dopo l'esposizione al veicolo o 25, 50, 100, 200 o 400 μM dell'antagonista selettivo per AMPAR NBQX per 48 ore. I confronti sono stati effettuati mediante ANOVA a una via con il test post-hoc di Dunnett. ** $P < 0,01$ dalle condizioni del veicolo (linea cellulare 1014). **(C).** Percentuale di cellule vitali 1014, YUMM1.7 o B16.F10 dopo l'esposizione al veicolo o 100, 200, 400 o 800 μM dell'antagonista selettivo NMDAR MK-801 per 48 h. ** $P < 0,01$ dalle condizioni del veicolo (linea cellulare 1014), ## $P < 0,01$ (linea cellulare YUMM1.7) dalle condizioni del veicolo, \$\$ $P < 0,01$ dalle condizioni del veicolo (linea cellulare B16.F10). I confronti sono stati effettuati tramite ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di Dunnett. **(D).** Percentuale di cellule proliferanti, immunoreattive al Ki67 dopo l'esposizione al veicolo o 400 μM MK-801 per 24 ore. Immagini rappresentative sono mostrate sul lato sinistro, mentre i grafici a punti che mostrano le quantificazioni relative al totale dei nuclei cellulari di ogni singolo esperimento sono mostrati sul lato destro. I confronti sono stati effettuati mediante test di Student non appaiati. * $P < 0,05$.

Valutando lo stato della segnalazione associata a NMDAR nelle cellule tumorali, abbiamo scoperto che l'espressione di PSD-95, una proteina essenziale per garantire la localizzazione di NMDAR sulle membrane superficiali e sulle post-sinapsi [42], è stato anche aumentato selettivamente nei tumori da Glu-CB₁Animali R-KO, supportando così l'idea che un asse di segnalazione glutammato-NMDAR favorisca la proliferazione delle cellule del melanoma (Figura5A). L'immunodetezione di NMDAR2B fosforilato a Y1252 (p-NMDAR2B) è stata precedentemente utilizzata come proxy per l'attivazione di NMDAR [20,43]. Sfortunatamente, nonostante numerosi tentativi, non siamo stati in grado di rilevare una colorazione affidabile di p-NMDAR2B mediante procedure di immunofluorescenza nei nostri campioni utilizzando anticorpi disponibili in commercio, e l'elevata abbondanza di melanina ha impedito un approccio immunoistochimico come precedentemente impiegato da altri [20,43]. Pertanto, in alternativa, abbiamo ottenuto estratti tumorali da una diversa coorte di animali e li abbiamo sottoposti a blotting per p-NMDAR2B. È interessante notare che un marcato aumento dei livelli di p-NMDAR2B era evidente nei campioni tumorali di Glu-CB₁Topi R-KO rispetto ai loro controlli corrispondenti, mentre questo effetto non era evidente nei tumori da GABA-CB₁Topi R-KO (Figura5B).

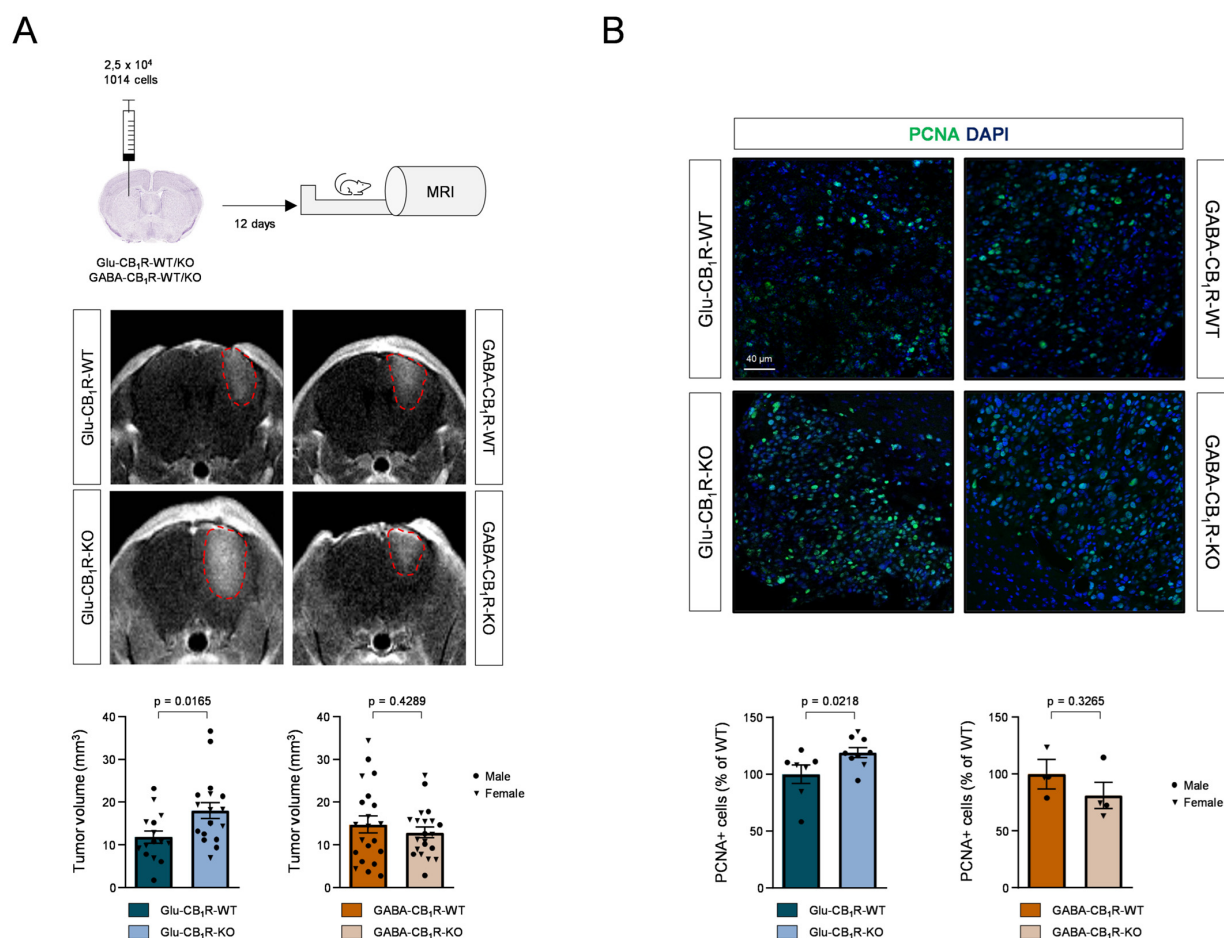


Figura 4. Neurone glutamatergico CB₁Gli R influenzano la crescita delle cellule del melanoma nel cervello. **(A)** Glu-CB₁R-KO, GABA-CB₁R-KO e quelli di controllo di entrambi i sessi sono stati iniettati per via intracranica con 25.000 cellule 1014 nello striato dorsale e, 12 giorni dopo, sottoposti a risonanza magnetica. Sono mostrate immagini rappresentative dei tumori intracranici e della quantificazione del volume tumorale. Cerchi: topi maschi; triangoli: topi femmine. I confronti sono stati effettuati mediante test di Student non appaiati. **(B)** Percentuale di cellule proliferanti immunoreattive al PCNA in fette di tumore cerebrale. Immagini rappresentative sono mostrate in alto, mentre i dot plot che mostrano le quantificazioni relative al totale dei nuclei cellulari sono mostrati in basso. I confronti sono stati effettuati mediante analisi di Student non appaiate. **Test.**

Successivamente, abbiamo mirato ad analizzare se l'azione del CB neuronale. Anche i recettori nel controllo del rilascio di glutammato erano importanti per l'extravasazione cellulare durante la formazione di MBM. Per studiare le fasi iniziali di colonizzazione di MBM piuttosto che solo la proliferazione cellulare [44], abbiamo iniettato 1014 cellule nell'arteria carotide di Glu-CB₁R-KO e GABA-CB₁R-KO e analizzato il carico tumorale in questi animali (Figura 6A). I dati non hanno rivelato differenze significative nei topi mutanti rispetto ai rispettivi compagni di cucciola di controllo di tipo selvatico (Figura 6A), suggerendo che l'aumento del volume tumorale osservato nell'approccio intracranico-allotraspianto è dovuto principalmente a un aumento della proliferazione cellulare e non è correlato a un'alterata extravasazione cellulare. Allo stesso modo, l'iniezione nella vena della coda [20] di 1014 cellule hanno colonizzato i polmoni in modo simile in Glu-CB₁R-KO rispetto agli animali di controllo (Figura 6B). Per valutare ulteriormente la specificità tissutale di questo CB cerebrale, l'asse proliferativo R/glutammato/NMDAR, 1014 cellule sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco di Glu-CB₁R-KO e i loro compagni di cucciola di controllo. Non sono state evidenziate differenze nell'insorgenza o nella crescita del tumore tra i due genotipi (Figura 6C). Presi insieme, questi esperimenti supportano un ambiente pro-tumorigenico specifico del cervello di Glu-CB₁R-KO, molto probabilmente a causa di una disinibizione del rilascio di glutammato dai terminali nervosi eccitatori.

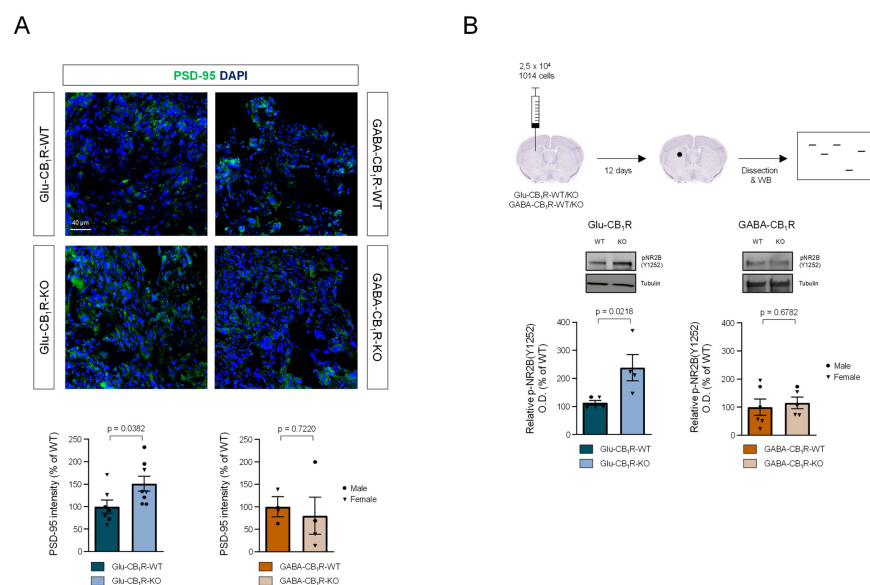


Figura 5. Neurone glutamatergico CB₁Gli R influenzano la segnalazione associata al recettore NMDAR nelle cellule del melanoma nel cervello. (UN). Immunoreattività PSD-95 in fette di tumore cerebrale. Immagini rappresentative sono mostrate in alto, mentre i dot plot che mostrano le quantificazioni (intensità di immunofluorescenza relativa al totale dei nuclei cellulari) sono mostrati in basso. I confronti sono stati effettuati mediante analisi di Student non appaiate. *t*-test. (B). Glu-CB₁R-KO, GABA-CB₁R-KO e topi di controllo di entrambi i sessi sono stati iniettati per via intracranica con 25.000 cellule 1014 nello striato dorsale e, 12 giorni dopo, i tumori sono stati dissezionati e sottoposti ad analisi Western blot (WB) per rilevare NMDAR2B fosforilato (attivo). Sono mostrate immagini rappresentative del blot e quantificazione della densità ottica relativa (OD). Cerchi: topi maschi; triangoli: topi femmine. I confronti sono stati effettuati mediante analisi di Student non appaiate. *t*-test.

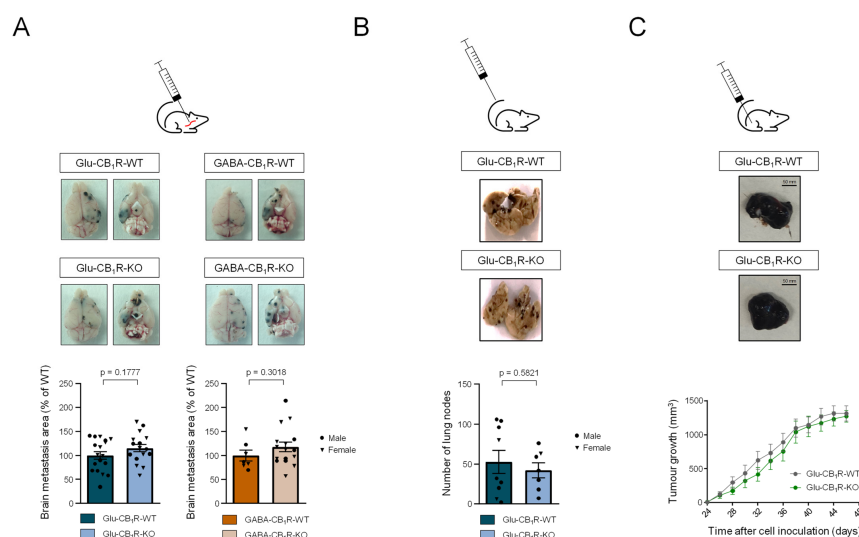


Figura 6. Neurone glutamatergico CB₁Gli R non influenzano la crescita delle cellule del melanoma al di fuori del cervello. (UN). Glu-CB₁R-KO, GABA-CB₁R-KO e i compagni di cucciola di controllo di entrambi i sessi sono stati iniettati 2×10⁵1014 cellule nell'arteria carotide comune. Tre settimane dopo, è stato quantificato il carico tumorale cerebrale. I confronti sono stati effettuati mediante dati non appaiati di Student. *t*-test. (B). Glu-CB₁R-KO e compagni di cucciola di controllo di entrambi i sessi sono stati iniettati nella vena laterale della coda con 0,5×10⁶1014 cellule. Tre settimane dopo, metastatico *fuochine* polmoni sono stati contati manualmente. I confronti sono stati effettuati tramite Studenti non appaiati *t*-test. (C). Glu-CB₁R-KO e i compagni di cucciola di controllo di entrambi i sessi sono stati iniettati sottocutaneamente in un fianco con 2×10⁶1014 cellule. Il volume del tumore è stato misurato a giorni alterni. I confronti sono stati effettuati mediante dati non appaiati di Student. *t*-test per ogni punto temporale. In tutti i pannelli, cerchi: topi maschi; triangoli: topi femmine.

4. Discussion

Nonostante i traguardi raggiunti nel trattamento del melanoma, molti individui muoiono a causa di questa malattia devastante, in particolare coloro che sviluppano MBM. Sfortunatamente, esistono solo pochi e difficilmente efficaci interventi terapeutici per i MBM [3]. Pertanto, l'identificazione dei meccanismi molecolari che influenzano selettivamente la crescita delle cellule di melanoma nel cervello è fondamentale per identificare nuovi bersagli farmacologici. In questo studio, combinando il data mining in silico con approcci sperimentali in vitro e in vivo, sveliamo un asse di segnalazione senza precedenti per la proliferazione delle cellule di MBM che coinvolge CB₁Rs, glutammato secreto dai neuroni e attivazione dei recettori NMDAR delle cellule del melanoma.

Questa azione pro-tumorigenica del glutammato si aggiunge alle precedenti osservazioni che riportano che questo neurotrasmettitore influenza la proliferazione delle cellule del glioma e promuove la crescita tumorale invasiva dei tumori al seno, al pancreas e neuroendocrini attraverso AM-PAR e NMDAR [20–22,34]. Effetti simili si verificano infatti nelle cellule del melanoma, che prosperano quando esposte ad alti livelli di glutammato [45], e alla fine muoiono a seguito dell'esposizione all'inibitore del rilascio del glutammato riluzolo [46]. In linea con i precedenti rapporti, mostriamo che le cellule del melanoma esprimono diversi recettori del glutammato, inclusi i recettori NMDAR [47,48], e che il loro blocco farmacologico (con MK-801) compromette la proliferazione delle cellule del melanoma. Queste osservazioni assomigliano a quelle ottenute con altri tipi di cellule cancerose [49], così come quelli con un modello di xenotrapianto basato su cellule di melanoma [47]. Tuttavia, nonostante questa pletora di prove, il ruolo del glutammato come fattore proliferativo specifico del cervello per il melanoma non è stato ancora affrontato in dettaglio.

Finora, la maggior parte degli studi aveva considerato il glutammato come un segnale autocrino prodotto dalla cellula cancerosa stessa [50,51], compresa la cellula del melanoma [32,52] e, per quanto a nostra conoscenza, la potenziale origine neuronale di questo glutammato pro-oncogenico sui MBM è stata trascurata. Consideriamo quest'ultima possibilità plausibile per diverse ragioni: (i) altri metaboliti abbondanti nel sistema nervoso centrale, come il lattato e i corpi chetonici, promuovono le metastasi del melanoma [53]; (ii) il melanoma e altre cellule cancerose stabiliscono nel cervello vie di comunicazione con neuroni e astrociti, dirottando così i percorsi di segnalazione neuronali e gliali [17,18,20–23]; e (iii) le cellule del melanoma adottano nel cervello un fenotipo simile a quello dei neuroni, adattativo al cervello, che regola positivamente diversi geni coinvolti nella formazione delle sinapsi (ad esempio, SNCA), nell'adesione cellulare (ad esempio, LRRC1) e nel rilevamento dei fattori neurotrofici (ad esempio, NGFR) [54,55], tutti elementi che supportano fortemente un'interazione con i componenti cerebrali. È interessante notare che un recente rapporto ha dimostrato che il trattamento dei topi con spazzini del glutammato riduce le concentrazioni di glutammato nel sangue e nel liquido cerebrospinale, in associazione con una diminuzione della crescita delle cellule di melanoma cerebrale [56]. Pertanto, il glutammato sembra un importante fattore pro-tumorigenico per le cellule di melanoma cerebrale e, logicamente, i neuroni glutamatergici rappresentano una potenziale fonte di glutammato. Seguendo questa nozione, abbiamo scoperto che 1014 cellule di melanoma iniettate nel cervello (ma non quando inoculate in altri siti) di Glu-CB₁I topi R-KO proliferano in modo più marcato rispetto ai topi di tipo selvatico o GABA-CB₁Topi R-KO. Il modello di iniezione intracranica è ideale per identificare i fattori che favoriscono la crescita delle cellule del melanoma cerebrale, che rappresenta un passaggio critico per la gestione clinica degli MBM piuttosto che l'invasione/stravasazione cellulare, poiché la maggior parte dei pazienti mostra già focolai metastatici al momento della diagnosi [57]. Tumori in crescita nel cervello di Glu-CB₁I topi R-KO hanno mostrato una maggiore attivazione dei recettori NMDAR (valutata dalla fosforilazione della subunità NMDAR2B e dall'espressione della proteina adattatrice NMDAR PSD-95) e un'aumentata espressione del marcatore di proliferazione PCNA. Questa osservazione supporta fortemente l'esistenza di un'interazione tra neuroni e cellule di melanoma, dato che i neuroni glutamatergici rilasciano maggiori quantità di glutammato nel Glu-CB₁Ceppo di topi R-KO [41], e che il glutammato aumenta la proliferazione di 1014 e altre linee cellulari di melanoma in vitro [45].

Gli NMDAR sono eterotetrameri composti da due subunità NMDAR1 e due subunità NMDAR2 o due subunità NMDAR3, che di solito sono esclusive. È interessante notare che le mutazioni dirompenti nel *GRIN2A* geni sono frequenti nel melanoma [58], e sono associati a una prognosi sfavorevole [59]. Per conciliare queste osservazioni apparentemente paradossali, ipotizziamo che la composizione delle subunità dei recettori NMDAR, che ha un impatto drammatico sulla funzionalità del recettore

proprietà [60], potrebbe influenzare la crescita delle cellule del melanoma. Sorprendentemente, nel set di dati GDC-TCGA SKCM, un'elevata espressione di *GRIN3A* è associato a una sopravvivenza complessiva più lunga (bassa *GRIN3A* sopravvivenza mediana: 1960 giorni; alta *GRIN3A* sopravvivenza mediana: 4930 giorni; $P < 0,0001$ tramite il test Log-rank (Mantel–Cox). Pertanto, una spiegazione plausibile da esplorare in futuro è che le forme mutanti di *GRIN2A* e/o una bassa espressione di *GRIN3A* favoriscono l'integrazione di altre subunità, come NMDAR2B, che a loro volta alterano le proprietà biofisiche di NMDAR favorendo un asse di segnalazione proliferativo. Sono necessarie ulteriori ricerche per identificare effettori a valle che, in seguito all'attivazione di NMDAR, sostengono la proliferazione delle MBM.

D'altro canto, il potenziale coinvolgimento dell'ECS, e in particolare del CB1Rs, nella crescita di MBM, non dovrebbe sorprendere, poiché l'attivazione di questo recettore si verifica generalmente quando l'omeostasi è perturbata nel cervello e in altri tessuti [61]. Attivazione farmacologica del CB1Rs in seguito a somministrazione sistemica di agonisti dei cannabinoidi innesca l'apoptosi delle cellule tumorali in numerosi modelli murini di cancro, in particolare il glioblastoma, la forma più comune di cancro al cervello [62,63], ma in che misura questo evento si basa, almeno in parte, su CB1Rs localizzate sulle cellule che formano il microambiente tumorale (come i neuroni nei MBM) rimangono in gran parte sconosciute. È stato precedentemente dimostrato che la somministrazione di cannabinoidi inibisce la crescita delle cellule di melanoma nei modelli murini di allotrapianto sottocutaneo e limita la colonizzazione di fegato e polmoni da parte delle cellule di melanoma [10,12]. Siamo consapevoli che una delle carenze del presente studio è che non sono stati condotti esperimenti farmacologici su MBM in vivo. Un trattamento farmacologico, in linea di principio, non è specifico per una determinata popolazione cellulare. Nel nostro caso, in generale, una somministrazione sistemica di cannabinoidi a topi portatori di MBM colpirà ogni cellula corporea che esprime CB1Rs o CB2Rs, precludendo quindi l'interpretazione dei risultati ottenuti. Idealmente, per sezionare le sottopopolazioni precise di CB1Rs coinvolti, questi esperimenti dovrebbero essere condotti con (i) diverse dosi di un CB1Antagonista selettivo e CB1Agonista R-selettivo (più il loro controllo del veicolo); (ii) varie linee di topi geneticamente modificati della stessa età (almeno Glu-CB1R-KO e GABA-CB1Topi R-KO, più il loro CB1compagni di cucciola R-floxed); e (iii) CB1R-WT e CB1Cellule di melanoma R-KO. Questi esperimenti esulano dallo scopo del presente studio e saranno oggetto di future ricerche da parte del nostro gruppo.

5. Conclusioni

Questo lavoro fornisce un nuovo quadro concettuale per comprendere i fattori molecolari che contribuiscono ai MBM. La dimostrata dipendenza della proliferazione delle cellule del melanoma dai recettori NMDAR e il ruolo chiave dei recettori CB1Rs localizzate sui terminali nervosi eccitatori nel controllo del rilascio di glutammato suggeriscono che l'attivazione di CB1Rs/inibizione selettiva di recettori Rs su tali terminali e/o l'inibizione degli effettori a valle dei recettori NMDAR specifici del melanoma (cerebrale) potrebbero essere valutati come nuovi interventi terapeutici per sopprimere i tumori del midollo osseo (MBM). Prevediamo pertanto che questo studio possa contribuire a progettare strategie volte a colpire la segnalazione glutamatergica neuronale nei tumori del midollo osseo (MBM).

Materiali supplementari: Le seguenti informazioni di supporto possono essere scaricate da: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15092439/s1>, Figura S1: Scansioni non ritagliate di tutti i blot dello studio.

Contributi degli autori: Concettualizzazione, CC-I. e MG; metodologia, CC-I., MS-V., SB-B., FJR-B., EP-G., CS, BS-L. e MG; software, CC-I., MS-V., SB-B., CB e FJR-B.; convalida, CC-I., MS-V., SB-B., FJR-B., BS-L. e MG; analisi formale, CC-I., MS-V., SB-B., FJR-B., BS-L. e MG; indagine, CC-I., MS-V., SB-B., CB e FJR-B.; risorse, CC-I., GM, EP-G., CS, BS-L. e MG; cura dei dati, CC-I., FJR-B., BS-L. e MG; scrittura - preparazione della bozza originale, CC-I. e MG; scrittura - revisione e editing, CC-I., MS-V., SB-B., FJR-B., GM, EP-G., CS, BS-L. e MG; visualizzazione, CC-I., MS-V., FJR-B., BS-L. e MG; supervisione, CC-I., EP-G., CS, BS-L. e MG; amministrazione del progetto, CC-I., FJR-B., BS-L. e MG; acquisizione dei finanziamenti, EP-G., CS, BS-L. e MG. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Questa ricerca è stata finanziata dalla Spagna *Ministerio de la Ciencia e de la Innovación* (MICIN); sostenuto con fondi europei di sviluppo regionale (FEDER); numeri di sovvenzione PID2021-125118OB-I00 a MG, PID2019-106852RB-I00 a BS-L., e PI17/00041 e PI20/00590 a CS e EP-G.) e da Fundación Canna (numero di sovvenzione 2023/0036 a MG). GM è stato supportato da INSERM. CC-I. è stato supportato da un contratto con la Spagna *Ministerio de Universidades* (*Formación del Profesorado Universitario* Programma, riferimento FPU16/02593). MS-V. è stato supportato da un contratto da *Universidad Complutense de Madrid* (*Contratos Predoctorales UCM* Programma).

Dichiarazione del Comitato di revisione istituzionale: I protocolli di studio sugli animali sono stati approvati dai comitati di revisione istituzionale di *Universidad Complutense de Madrid* e *Comunidad de Madrid* (codice protocollo PROEX 209/18, data di approvazione 25/02/2019) e *Instituto de Neuroscienze* (codice protocollo CSIC-UMH 2019/VSC/PEA/0159, data di approvazione 19/06/2019), in accordo con le direttive del Governo spagnolo e della Commissione Europea.

Dichiarazione di consenso informato: Non applicabile.

Dichiarazione di disponibilità dei dati: Tutti i dati sorgente generati o analizzati durante lo studio sono inclusi in questo articolo.

Ringraziamenti: Siamo in debito con Esti Gabika, Anibal SÚNchez de la Torre e il personale dei servizi principali di risonanza magnetica e microscopia confocale dell'Università Complutense di Madrid per la loro assistenza tecnica qualificata.

Conflitti di interesse: Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta, analisi o interpretazione dei dati, nella stesura del manoscritto o nella decisione di pubblicare i risultati.

Riferimenti

- Schadendorf, D.; Fisher, D.E.; Garbe, C.; Gershenwald, J.E.; Grob, J.J.; Halpern, A.; Herlyn, M.; Marchetti, M.A.; McArthur, G.; Ribas, A.; et al. Melanoma. *Primers di disapprovazione nazionale* **2015**, *1*, 15003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Memon, A.; Bannister, P.; Rogers, I.; Sundin, J.; Al-Ayadhy, B.; James, P.W.; McNally, R.J. Cambiamenti nell'epidemiologia e nell'incidenza specifica per età del melanoma maligno cutaneo in Inghilterra: un'analisi dei dati di registrazione nazionale del cancro per età, sesso e sede anatomica, 1981-2018. *Lancet Reg. Health-Eur.* **2021**, *2*, 100024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gutzmer, R.; Vordermark, D.; Hassel, J.C.; Krex, D.; Wendl, C.; Schadendorf, D.; Sickmann, T.; Rieken, S.; Pukrop, T.; Höller, C.; et al. Metastasi cerebrali del melanoma: raccomandazioni per la gestione interdisciplinare 2020. *Curatore del cancro. Rev.* **2020**, *89*, 102083. [\[CrossRef\]](#)
- Patton, E.E.; Mueller, K.L.; Adams, D.J.; Anandasabapathy, N.; Aplin, A.E.; Bertolotto, C.; Bosenberg, M.; Ceol, C.J.; Burd, C.E.; Chi, P.; et al. Modelli di melanoma per la prossima generazione di terapie. *Cellula cancerosa* **2021**, *39*, 610–631. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Smedby, K.E.; Brandt, L.; Backlund, M.L.; Blomqvist, P. Ricoveri di metastasi cerebrali in Svezia tra il 1987 e il 2006. *Fratello J. Cancro* **2009**, *101*, 1919–1924. [\[CrossRef\]](#)
- Barnholtz-Sloan, J.S.; Sloan, A.E.; Davis, F.G.; Vigneau, F.D.; Lai, P.; Sawaya, R.E. Proporzioni di incidenza delle metastasi cerebrali nei pazienti diagnosticati (dal 1973 al 2001) nel Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 2865–2872. [\[CrossRef\]](#)
- Long, G.V.; Atkinson, V.; Lo, S.; Sandhu, S.; Guminski, A.D.; Brown, M.P.; Wilmott, J.S.; Edwards, J.; Gonzalez, M.; Scolyer, R.A.; et al. Combinazione di nivolumab e ipilimumab o nivolumab da solo nelle metastasi cerebrali del melanoma: uno studio multicentrico randomizzato di fase 2. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 672–681. [\[CrossRef\]](#)
- Bander, E.D.; Yuan, M.; Carnevale, J.A.; Reiner, A.S.; Panageas, K.S.; Postow, M.A.; Tabar, V.; Moss, N.S. Presentazione, trattamento e risultati delle metastasi cerebrali del melanoma nell'era delle terapie mirate e delle immunoterapie. *Cancro* **2021**, *127*, 2062–2073. [\[CrossRef\]](#)
- Cristino, L.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. Cannabinoidi e sistema endocannabinoide espanso nei disturbi neurologici. *Nat. Rev. Neurol.* **2020**, *16*, 9–29. [\[CrossRef\]](#)
- Nero UNZquez, C.; Carracedo, A.; Barrado, L.; José Reale, P.; Luis Fern UNdez-Luna, J.; Velasco, G.; Malumbre, M.; Guzm UNn, M.; BIUN zquez, C.; Carracedo, A.; et al. Recettori dei cannabinoidi come nuovi bersagli per il trattamento del melanoma. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2633–2635. [\[CrossRef\]](#)
- Velasco, G.; SÚNchez, C.; Guzm UNn, M. Endocannabinoidi e cancro. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2015**, *231*, 449–472. [\[PubMed\]](#)
- Armstrong, J.L.; Hill, D.S.; McKee, C.S.; Hernandez-Tiedra, S.; Lorente, M.; Lopez-Valero, I.; Anagnostou, M.E.; Babatunde, F.; Corazzari, M.; Redfern, C.P.F.; et al. Sfruttamento dell'autofagia citotossica indotta dai cannabinoidi per indurre la morte delle cellule del melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2015**, *135*, 1629–1637. [\[CrossRef\]](#)
- Herkenham, M.; Lynn, A.B.; Little, M.D.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; De Costa, B.R.; Rice, K.C. Localizzazione del recettore dei cannabinoidi nel cervello. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1932–1936. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cabral, G.A.; Raborn, E.S.; Griffin, L.; Dennis, J.; Marciano-Cabral, F. Recettori CB2 nel cervello: ruolo nella funzione immunitaria centrale. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 240–251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Piomelli, D. La logica molecolare della segnalazione endocannabinoide. *Rettore Nazionale di Neuroscienze* **2003**, *4*, 873–884. [\[CrossRef\]](#)
16. Monje, M.; Borniger, J.C.; D'Silva, N.J.; Deneen, B.; Dirks, P.B.; Fattahi, F.; Frenette, P.S.; Garzia, L.; Gutmann, D.H.; Hanahan, D.; et al. Tabella di marcia per il campo emergente delle neuroscienze contro il cancro. *Cella* **2020**, *181*, 219–222. [\[CrossRef\]](#)
17. Kleffman, K.; Levinson, G.; Rosa, I.V.L.; Blumenberg, L.M.; Shadaloey, S.A.A.; Dhabaria, A.; Wong, E.; GalUNN-Echevarria, F.; Karz, A.; Argibay, D.; et al. La beta amiloide secreta dal melanoma sopprime la neuroinfiammazione e favorisce le metastasi cerebrali. *Cancro Scov.* **2022**, *12*, 1314–1335. [\[CrossRef\]](#)
18. Priego, N.; Zhu, L.; Monteiro, C.; Mulders, M.; Wasilewski, D.; Bindeman, W.; Doglio, L.; Martionez, L.; Martionez-Saez, E.; Cajal, S.R.Y.; et al. STAT3 etichetta una sottopopolazione di astrociti reattivi necessari per le metastasi cerebrali. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1024–1035. [\[CrossRef\]](#)
19. Chen, D.; Boire, A.; Jin, X.; Valente, M.; Ehm, E.E.; Lopez-Soto, A.; Giacobbe, Los Angeles; Patwa, R.; Shah, H.; Xu, K.; et al. Le giunzioni del gap tra carcinoma e astrociti promuovono la metastasi cerebrale mediante trasferimento CGAMP. *Natura* **2016**, *533*, 493–498. [\[CrossRef\]](#)
20. Zeng, Q.; Michael, I.P.; Zhang, P.; Saghafeina, S.; Knott, G.; Jiao, W.; McCabe, B.D.; GalvUNN, J.A.; Robinson, H.P.C.; Zlobec, I.; et al. La prossimità sinaptica consente alla segnalazione NMDAR di promuovere le metastasi cerebrali. *Natura* **2019**, *573*, 526–531. [\[CrossRef\]](#)
21. Venkatesh, H.S.; Morishita, W.; Geraghty, A.C.; Silverbush, D.; Gillespie, S.M.; Arzt, M.; Tam, L.T.; Espenel, C.; Ponnuswami, A.; Ni, L.; et al. Integrazione elettrica e sinaptica del glioma nei circuiti neurali. *Natura* **2019**, *573*, 539–545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Venkataramani, V.; Tanev, D.I.; Strahle, C.; Studier-Fischer, A.; Fankhauser, L.; Kessler, T.; Körber, C.; Kardorff, M.; Ratliff, M.; Xie, R.; et al. L'input sinaptico glutamatergico alle cellule del glioma guida la progressione del tumore al cervello. *Natura* **2019**, *573*, 532–538. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Venkataramani, V.; Yang, Y.; Schubert, M.C.; Reyhan, E.; Tetzlaff, S.K.; Wißmann, N.; Botz, M.; Soyka, S.J.; Beretta, California; Pramatarov, R.L.; et al. Il glioblastoma diretta i meccanismi neuronali per l'invasione cerebrale. *Cella* **2022**, *185*, 2899–2917.e31. [\[CrossRef\]](#)
24. Goldman, M.J.; Craft, B.; Hastie, M.; Repečka, K.; McDade, F.; Kamath, A.; Banerjee, A.; Luo, Y.; Rogers, D.; Brooks, A.N.; et al. Visualizzazione e interpretazione dei dati di genomica del cancro tramite la piattaforma Xena. *Nat. Biotechnologie* **2020**, *38*, 675–678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Petit, V.; Raymond, J.; Alberti, C.; Pouteaux, M.; Gallagher, S.J.; Nguyen, M.Q.; Aplin, A.E.; Delmas, V.; Larue, L. Le linee cellulari di melanoma di topo congenico C57BL/6 NRASQ61K sono altamente sensibili alla combinazione di inibitori di Mek e Akt in vitro e in vivo. *Melanoma a cellule pigmentate Res.* **2019**, *32*, 829–841. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Costas-Insua, C.; Moreno, E.; Maroto, I.B.; Ruiz-Calvo, A.; Bajo-Grañeras, R.; Martion-Gutiérrez, D.; Diez-Alarcia, R.; Teresa Vilaro, M.; Cortès, R.; Garcia-Font, N.; et al. Identificazione di BiP come proteina interagente con il recettore CB1 che regola con precisione la segnalazione dei cannabinoidi nel cervello del topo. *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 7924–7941. [\[CrossRef\]](#)
27. Monory, K.; Massa, F.; EgertovUN, M.; Eder, M.; Blaudzun, H.; Westenbroek, R.; Kelsch, W.; Giacobbe, W.; Marsch, R.; Ekker, M.; et al. Il sistema endocannabinoide controlla i principali circuiti epilettogeni nell'ippocampo. *Neurone* **2006**, *51*, 455–466. [\[CrossRef\]](#)
28. Monory, K.; Blaudzun, H.; Massa, F.; Kaiser, N.; Lemberger, T.; Schütz, G.; Wotjak, C.T.; Lutz, B.; Marsicano, G. Dissezione genetica degli effetti comportamentali e autonomici di Δ^9 -Tetraidrocannabinolo nei topi. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e269. [\[CrossRef\]](#)
29. Zhao, Z.; Yang, J.; Zhao, H.; Fang, X.; Li, H. Il recettore dei cannabinoidi 2 è sovraregolato nel melanoma. *J. Cancer Res. Ther.* **2012**, *8*, 549–554. [\[CrossRef\]](#)
30. Baba, Y.; Funakoshi, T.; Mori, M.; Emoto, K.; Masugi, Y.; Ekmekcioglu, S.; Amagai, M.; Tanese, K. Espressione della lipasi monoacilglicerolo come marcatore di invasione e progressione tumorale nel melanoma maligno. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2017**, *31*, 2038–2045. [\[CrossRef\]](#)
31. Pollock, P.M.; Cohen-Solal, K.; Sood, R.; Namkoong, J.; Martino, J.J.; Koganti, A.; Zhu, H.; Robbins, C.; Makalowska, I.; Shin, S.S.; et al. Il modello murino di melanoma implica la segnalazione metabotropica del glutammato nella neoplasia melanocitica. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 108–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Namkoong, J.; Shin, S.S.; Hwa, J.L.; Marion, Y.E.; Wall, B.A.; Goydos, J.S.; Chen, S. Recettore metabotropico del glutammato 1 e segnalazione del glutammato nel melanoma umano. *Ricerca sul cancro* **2007**, *67*, 2298–2305. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Lyons, S.A.; Chung, W.J.; Weaver, A.K.; Ogunrinu, T.; Sontheimer, H. La segnalazione autocrina del glutammato promuove l'invasione delle cellule del glioma. *Ricerca sul cancro* **2007**, *67*, 9463–9471. [\[CrossRef\]](#)
34. Li, L.; Hanahan, D. Dirottamento del circuito di segnalazione NMDAR neuronale per promuovere la crescita e l'invasione del tumore. *Cella* **2013**, *153*, 86–100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Meeth, K.; Wang, J.X.; Micevic, G.; Damsky, W.; Bosenberg, M.W. Le linee YUMM: una serie di linee cellulari di melanoma di topo congenite con alterazioni genetiche definite. *Melanoma a cellule pigmentate Res.* **2016**, *29*, 590–597. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Akbani, R.; Akdemir, K.C.; Aksoy, B.A.; Albert, M.; Ally, A.; Amin, S.B.; Arachchi, H.; Arora, A.; Auman, J.T.; Ayala, B.; et al. Classificazione genomica del melanoma cutaneo. *Cella* **2015**, *161*, 1681–1696. [\[CrossRef\]](#)
37. Melnikova, V.O.; Bolshakov, S.V.; Walker, C.; Ananthaswamy, H.N. Alterazioni genomiche nelle linee cellulari di melanoma murino spontaneo e indotto da cancerogeni. *Oncogene* **2004**, *23*, 2347–2356. [\[CrossRef\]](#)
38. Kingston, A.E.; Ornstein, P.L.; Wright, R.A.; Johnson, B.G.; Mayne, N.G.; Burnett, J.P.; Belagaje, R.; Wu, S.; Schoepp, D.D. LY341495 è un antagonista nanomolare potente e selettivo dei recettori del glutammato metabotropico del gruppo II. *Neurofarmacologia* **1998**, *37*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
39. Sheardown, M.J.; Nielsen, E.; Hansen, A.J.; Jacobsen, P.; Onore, T. 2,3-Diidrossi-6-Nitro-7-Sulfamoi-Benzo(F)Chinossalina: un neuroprotettore per l'ischemia cerebrale. *Scienza* **1990**, *247*, 571–574. [\[CrossRef\]](#)
40. Wong, E.H.F.; Kemp, J.A.; Priestley, T.; Knight, A.R.; Woodruff, G.N.; Iversen, L.L. L'anticonvulsivante MK-801 è un potente antagonista dell'N-metil-D-aspartato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 7104–7108. [\[CrossRef\]](#)

41. Ruiz-Calvo, A.; Maroto, IB; Bajo-Grañeras, R.; Chiarlone, A.; Gaudioso, UN.; Ferrero, JJ; Resel, E.; SUNnchez-Prieto, J.; Rodrioguez-Navarro, JA; Marsicano, G.; et al. Controllo specifico del percorso della vulnerabilità dei neuroni striatali da parte dei recettori CB1 dei cannabinoidi corticostriatali. *Corteccia cerebrale* **2018**, *28*, 307–322. [\[CrossRef\]](#)
42. Prybylowski, K.; Chang, K.; Sans, N.; Kan, L.; Vicini, S.; Wenthold, RJ La localizzazione sinaptica dei recettori NMDA contenenti NR2B è controllata dalle interazioni con le proteine PDZ e AP-2. *Neurone* **2005**, *47*, 845–857. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Levy, AD; Xiao, X.; Shaw, JE; Sudarsana Devi, SP; Katrancha, SM; Bennett, AM; Greer, CA; Howe, JR; Machida, K.; Koleske, AJ La SHP2 associata alla sindrome di Noonan defosforila GluN2B per regolare la funzione del recettore NMDA. *Rappresentante della cellula* **2018**, *24*, 1523–1535. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Liu, Z.; Wang, Y.; Kabraji, S.; Xie, S.; Pan, P.; Liu, Z.; Ni, J.; Zhao, JJ Miglioramento dei modelli murini ortotopici di metastasi cerebrali del cancro al seno derivate dal paziente mediante un metodo di iniezione intracarotidea modificato. *Rappresentante scientifico* **2019**, *9*, 622. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Wasinger, C.; Hofer, A.; Spadiut, O.; Hohenegger, M. Firma degli amminoacidi nelle linee cellulari del melanoma umano provenienti da diversi stadi della malattia. *Rappresentante scientifico* **2018**, *8*, 6254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Wall, BA; Wangari-Talbot, J.; Shin, SS; Schiff, D.; Sierra, J.; Yu, LJ; Khan, A.; Haffty, B.; Goydos, JS; Chen, S. L'interruzione della segnalazione mediata da GRM1 mediante riluzolo provoca danni al DNA nelle cellule del melanoma. *Melanoma a cellule pigmentate Res.* **2014**, *27*, 263–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Song, Z.; He, CD; Liu, J.; Sun, C.; Lu, P.; Li, L.; Gao, L.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Shan, L.; et al. Il blocco della segnalazione mediata dal glutammato inibisce la crescita e la migrazione del melanoma umano. *Exp. Dermatol.* **2012**, *21*, 926–931. [\[CrossRef\]](#)
48. Hajdú, T.; JuhUNsz, T.; Szűcs-Somogyi, C.; RUNcz, K.; ZUNKUNny, R. NR1 e NR3B hanno composto complessi recettoriali intranucleari N-metil-d-aspartato nelle cellule di melanoma umano. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1929. [\[CrossRef\]](#)
49. Rzeski, W.; Ikonomidou, C.; Turski, L. Gli antagonisti del glutammato limitano la crescita del tumore. *Biochimica. Farmacologica.* **2002**, *64*, 1195–1200. [\[CrossRef\]](#)
50. Takano, T.; Lin, JHC; Arcuino, G.; Gao, Q.; Yang, J.; Nedergaard, il rilascio di M. Glutammato promuove la crescita di gliomi maligni. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1010–1015. [\[CrossRef\]](#)
51. Sontheimer, H. Gliomi maligni: alterare l'omeostasi del glutammato e degli ioni per un vantaggio selettivo. *Tendenze Neurosci.* **2003**, *26*, 543–549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Konstantakou, EG; Velentzas, AD; Anagnostopoulos, AK; Litou, ZI; Konstandi, OA; Giannopoulou, AF; Anastasiadou, E.; Voutsinas, GE; Tsangaris, GT; Stravopodis, DJ Mappatura del proteoma profondo delle cellule di melanoma metastatico umano WM-266-4: dalla dipendenza oncogenica agli obiettivi farmacologici. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Tasdogan, A.; Faubert, B.; Ramesh, V.; Ubellacker, JM; Shen, B.; Solmonson, A.; Murphy, MM; Gu, Z.; Gu, W.; Martin, M.; et al. L'eterogeneità metabolica conferisce differenze nel potenziale metastatico del melanoma. *Natura* **2019**, *577*, 115–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Nygaard, V.; Prasmickaite, L.; Vasiliauskaite, K.; Clancy, T.; Hovig, E. La colonizzazione cerebrale del melanoma comporta l'emergere di un fenotipo adattivo al cervello. *Oncoscienza* **2014**, *1*, 82–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Biermann, J.; Melms, JC; Amin, AD; Wang, Y.; Caprio, LA; Karz, A.; Tagore, S.; Barrera, I.; Ibarra-Arellano, MA; Andreatta, M.; et al. Analisi dell'ecosistema ingenuo al trattamento delle metastasi cerebrali del melanoma umano. *Cella* **2022**, *185*, 2591–2608.e30. [\[CrossRef\]](#)
56. Goldshmit, Y.; Perelroizen, R.; Yakovčuk, A.; Banyas, E.; Mayo, L.; David, S.; Benbenishty, A.; Blinder, P.; Shalom, M.; Ruban, A. Gli scavenger del glutammato nel sangue aumentano la segnalazione pro-apoptotica e riducono la crescita del melanoma metastatico in vivo. *Rappresentante scientifico* **2021**, *11*, 14644. [\[CrossRef\]](#)
57. Staudt, M.; Lasithiotakis, K.; Leiter, U.; Meier, F.; Eigentler, T.; Bamberg, M.; Tatagiba, M.; Brossart, P.; Garbe, C. Determinanti della sopravvivenza nei pazienti con metastasi cerebrali da melanoma cutaneo. *Fratello J. Cancro* **2010**, *102*, 1213–1218. [\[CrossRef\]](#)
58. Wei, X.; Walia, V.; Lin, JC; Teer, JK; Prickett, TD; Gartner, J.; Davis, S.; Stemke-Hale, K.; Davies, MA; Gershenwald, JE; et al. Il sequenziamento dell'esoma identifica GRIN2A come frequentemente mutato nel melanoma. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 442–446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. D'mello, SAN; Flanagan, JU; Verde, Tennessee; Leung, EY; Askarian-Amiri, ME; Giuseppe, WR; McCrystal, signor; Isaacs, RJ; Shaw, JHF; Furneaux, CE; et al. Prove che le mutazioni GRIN2A nel melanoma sono correlate a una ridotta sopravvivenza. *Fronte. Oncol.* **2014**, *4*, 333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Paoletti, P.; Bellone, C.; Zhou, Q. Diversità delle subunità del recettore NMDA: impatto sulle proprietà del recettore, plasticità sinaptica e malattia. *Rettore Nazionale di Neuroscienze.* **2013**, *14*, 383–400. [\[CrossRef\]](#)
61. Piazza, PV; Cota, D.; Marsicano, G. Il recettore CB1 come pietra angolare dell'esostasi. *Neurone* **2017**, *93*, 1252–1274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Galve-Roperh, I.; SUNnchez, C.; Cortès, ML; del Pulgar, TG; Izquierdo, M.; GuzmUNn, M. Azione antitumorale dei cannabinoidi: coinvolgimento dell'accumulo prolungato di ceramide e dell'attivazione della chinasi regolata dal segnale extracellulare. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 313–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Velasco, G.; SUNnchez, C.; GuzmUNn, M. Verso l'uso dei cannabinoidi come agenti antitumorali. *Rev. Nat. Cancro* **2012**, *12*, 436–444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Nota dell'editore: Le dichiarazioni, le opinioni e i dati contenuti in tutte le pubblicazioni sono esclusivamente quelli dei singoli autori e collaboratori e non di MDPI e/o del/i curatore/i. MDPI e/o il/i curatore/i declinano ogni responsabilità per eventuali danni a persone o proprietà derivanti da idee, metodi, istruzioni o prodotti a cui si fa riferimento nel contenuto.