

**Titolo:** La prolattina autocrina stimola la crescita e la metastasi del carcinoma endometriale e riduce la sensibilità alla chemioterapia - Autocrine Prolactin Stimulates Endometrial Carcinoma Growth and Metastasis and Reduces Sensitivity to Chemotherapy

**Codice:** PRL006

**Autore:** Ding et al.

**Data:** 2017

**Rivista:** Endocrinology 158(6): 1595–1611

**Argomento:** prolattina

**Accesso libero:** si

**DOI:** <https://doi.org/10.1210/en.2016-1903>

**URL:** <https://academic.oup.com/endo/article/158/6/1595/2997446>

**Parole chiave:** carcinoma dell'endometrio, prolattina autocrina, oncogenesi, proliferazione, CD24

**Tumore:** carcinoma endometrio

**Traduzione:** tradotte le sezioni "Riassunto", "Introduzione" e "Discussione" dell'articolo, con solo alcune minime semplificazioni

**Punti di interesse:** In questo studio sono state analizzate cellule umane del carcinoma endometriale, impiantate anche su topi da laboratorio. Queste cellule sono state "forzate" a produrre prolattina umana e sono andati a vedere cosa questa prolattina prodotta artificialmente in modo autocrino (le cellule stesse la producono) causava. Hanno ricercato inoltre una correlazione tra prolattina autocrina e la proteina indicata con la sigla CD24. La CD24 è una piccola proteina presente nella membrana delle cellule, ampiamente espressa sulle cellule ematopoietiche, le cellule neurali e le cellule epiteliali. Il CD24 è coinvolto in diverse funzioni, agendo come marker per la differenziazione nelle cellule ematopoietiche e neuronali, come modulatore della risposta immunitaria adattativa e come molecola di adesione cellulare. La sovraespressione di CD24 è stata riportata in vari tipi di cancro, incluso il carcinoma endometriale. È stato dimostrato che l'espressione anomala di CD24 promuove l'oncogenesi, lo sviluppo del tumore e la metastasi dei tumori umani. La sua elevata espressione di CD24 è un indicatore prognostico di scarsa sopravvivenza nel carcinoma polmonare, prostatico, mammario e ovarico. È stato anche documentato che il CD24 determina resistenza ai farmaci antitumorali. I risultati dello studio indicano che la hPRL fatta produrre artificialmente dalle cellule del CE stimola proliferazione cellulare, sopravvivenza, invasione, migrazione e l'oncogenicità delle cellule umane di carcinoma endometriale. Anche nei trapianti in topi di queste cellule cancerose forzate a produrre in modo autocrino, la prolattina autocrina promuove la crescita tumorale e le metastasi. Inoltre la hPRL riduce la sensibilità ai trattamenti chemioterapici attraverso un aumento di espressione della CD24. Di interesse, oltre ai risultati riportati, sono le considerazioni fatte sulla relazione tra prolattina e tumori nella introduzione e nella discussione, che sono le seguenti:

- hPRL sierico funge da biomarcatore sensibile e specifico per la diagnosi precoce della CE e la combinazione di hPRL sierica con altri biomarcatori migliora ulteriormente l'accuratezza e la selettività della diagnosi di CE

- Un altro studio ha riportato **livelli sierici elevati di hPRL in pazienti con carcinoma endometriale** e ha dimostrato che l'hPRL esogena stimola la proliferazione e inibisce l'apoptosi indotta da cisplatino nelle cellule di CE (stessi effetti della prolattina autocrina)
- Il **trattamento cronico con hPRL promuove la trasformazione oncogenica** del fibroblasto endometriale immortalizzato e delle cellule epiteliali ovariche normali
- è stato riportato che un pannello di quattro biomarcatori sierici, incluso **hPRL, mostra una migliore prevedibilità nella diagnosi del carcinoma ovarico epiteliale in fase iniziale.**
- Oltre ai tumori ginecologici, diversi studi hanno sostenuto un **ruolo oncogeno dell'hPRL nel cancro al seno**
- Una recente meta-analisi che ha riportato un'**associazione tra il livello plasmatico di hPRL e un aumento del rischio di carcinoma mammario** postmenopausale, positivo per il recettore degli estrogeni/recettore del progesterone in situ e invasivo.
- Inoltre, è stata segnalata anche un'**associazione di iperprolattinemia con aumento delle dimensioni del tumore, stadio di malattia più elevato, coinvolgimento dei linfonodi, prognosi peggiore e maggior rischio di recidiva e mortalità** nel cancro al seno

#### Riassunto

**Il carcinoma endometriale (CE) avanzato e ricorrente mostra una scarsa risposta alla chemioterapia e bassi tassi di sopravvivenza. È stato precedentemente riportato che la prolattina umana (hPRL) è sovra-regolata nel cancro dell'endometrio ed è associata a risultati di sopravvivenza peggiori. Forniamo prove per il ruolo funzionale di hPRL nella progressione della CE. Abbiamo generato un modello per lo studio degli effetti funzionali delle cellule autocrine mediate da hPRL attraverso l'espressione forzata di hPRL nelle cellule CE umane. L'espressione di hPRL autocrina ha stimolato la proliferazione cellulare, la crescita indipendente dall'ancoraggio, la migrazione e l'invasione delle cellule CE e ha promosso la crescita del tumore, l'invasione locale e la colonizzazione metastatica nei modelli di xenotrapianto. Inoltre, l'espressione forzata di hPRL ha diminuito la sensibilità delle cellule CE ai farmaci chemioterapici (cioè doxorubicina e paclitaxel), sia in vitro che in vivo. Coerentemente, la piccola deplezione mediata da RNA interferente di hPRL ha ridotto significativamente l'oncogenicità e ha migliorato la chemiosensibilità delle cellule CE. Poiché CD24 è regolato da hPRL ed è stato implicato nella resistenza ai farmaci nella CE, abbiamo inoltre dimostrato che CD24 è un mediatore critico della ridotta sensibilità stimolata da hPRL alla doxorubicina e al paclitaxel nelle cellule CE. Pertanto, l'inibizione della segnalazione di hPRL è una potenziale strategia terapeutica per il trattamento dell'EC in fase avanzata, che può essere utilizzata in combinazione con la chemioterapia per migliorare la risposta chemioterapica.**

#### Introduzione

Il carcinoma endometriale (CE) rimane il tumore maligno più comune del tratto genitale femminile (1). Sebbene i casi di CE in stadio iniziale (stadio I o II) siano trattati con isterectomia e radioterapia con una prognosi favorevole, la CE in stadio avanzato (stadio III o IV) o ricorrente mostra invariabilmente una prognosi sfavorevole, con un tempo di sopravvivenza mediano di <1 anno (2, 3). L'isterectomia, insieme a una combinazione di chemioterapia e radioterapia, è comunemente usata come trattamento standard per i pazienti con EC avanzata e ricorrente (3). Gli agenti chemioterapici (tassani, antracicline e agenti al platino) producono tassi di risposta > 20% se usati come agenti singoli e dal 40% al 50% se usati in combinazione per il trattamento della CE avanzata e ricorrente (3). Inoltre, è stato riportato che la chemioterapia adiuvante fornisce benefici in termini di sopravvivenza nella CE in stadio III (3). Tuttavia, questi regimi chemioterapici non sono curativi

e i pazienti con CE in fase avanzata tendono a sviluppare una resistenza terapeutica e a manifestare recidiva della malattia (4). Ciò rafforza la necessità di identificare nuovi bersagli terapeutici oncogeni coinvolti nella CE che possono essere utilizzati in combinazione con agenti chemioterapici per migliorare la risposta alla chemioterapia e la prognosi della CE in fase avanzata e ricorrente (4).

La prolattina umana (hPRL), appartenente alla famiglia della prolattina (PRL)/ormone della crescita (GH)/lattogeno placentare, è un ormone polipeptidico secreto dall'ipofisi con le classiche funzioni endocrine (5, 6). Inoltre, hPRL è secreto da siti extrapituitari, comprese le ghiandole mammarie e l'endometrio, dove agisce localmente come fattore di crescita (5, 6). hPRL è fisiologicamente coinvolto nello sviluppo della ghiandola mammaria, nell'allattamento, nell'impianto e nella gravidanza (5, 6). Gli studi hanno fornito prove crescenti del coinvolgimento dell'hPRL autocrino/paracrino in diversi tumori, come il carcinoma mammario, prostatico, epatocellulare, ovarico ed endometriale (5, 7-14). È stato anche segnalato che hPRL sierico funge da biomarcatore sensibile e specifico per la diagnosi precoce della CE e la combinazione di hPRL sierica con altri biomarcatori migliora ulteriormente l'accuratezza e la selettività della diagnosi di CE (13). Un altro studio ha riportato livelli sierici elevati di hPRL nella CE e ha dimostrato che l'hPRL esogena stimola la proliferazione e inibisce l'apoptosi indotta da cisplatino nelle cellule EC (5). Più recentemente, il nostro gruppo ha osservato che l'espressione di hPRL, individualmente o combinata con l'espressione di GH umano, è correlata allo stadio e all'invasione miometriale ed è associata a una peggiore sopravvivenza libera da recidive e sopravvivenza globale nei pazienti con CE (12). Tuttavia, i ruoli funzionali dell'hPRL autocrino nella CE non sono stati completamente chiariti. hPRL è stato anche implicato nella resistenza chemioterapica nei tumori della mammella e della prostata (15-19), suggerendo il possibile coinvolgimento di hPRL nella modulazione della chemiosensibilità e/o della chemioresistenza nella CE.

Il CD24 è una piccola proteina sulla membrana delle cellule, ampiamente espressa sulle cellule ematopoietiche, inclusi i precursori delle cellule B, le cellule T, i neutrofili, le cellule neurali e le cellule epiteliali (20). Il CD24 è coinvolto in diverse funzioni, agendo come marker per la differenziazione nelle cellule ematopoietiche e neuronali, come modulatore della risposta immunitaria adattativa e come molecola di adesione cellulare (20). La sovraespressione di CD24 è stata riportata in vari tipi di cancro, incluso il CE (21, 22). È stato dimostrato che l'espressione anomala di CD24 promuove l'oncogenesi, lo sviluppo del tumore e la metastasi dei tumori umani (4, 23, 24). Inoltre, l'elevata espressione di CD24 è un indicatore prognostico di scarsa sopravvivenza nel carcinoma polmonare, prostatico, mammario e ovarico (22, 25, 26). È stato anche documentato che il CD24 determina resistenza ai farmaci antitumorali, inclusi cisplatino, doxorubicina e paclitaxel nel cancro ovarico e nella CE (4, 27). CD24 è un gene regolato da hPRL (28); tuttavia, il ruolo di CD24 nel comportamento del CE mediato da hPRL non è stato ben definito.

Nel presente studio, abbiamo definito un ruolo funzionale per hPRL autocrino nel CE. Abbiamo dimostrato che l'espressione forzata di hPRL nelle cellule del CE promuove la proliferazione cellulare, la crescita cellulare, la migrazione e l'invasione indipendenti dall'ancoraggio in vitro e aumenta lo sviluppo del tumore e le metastasi in vivo. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'hPRL autocrino riduce la sensibilità delle cellule CE verso la doxorubicina e il paclitaxel, che sono agenti chemioterapici comunemente usati per CE in fase avanzata (29). Concordemente, abbiamo osservato che la deplezione di hPRL riduce l'oncogenicità e aumenta la sensibilità delle cellule del CE alla doxorubicina e al paclitaxel. Pertanto, l'hPRL autocrino è un potenziale bersaglio terapeutico nella CE e gli antagonisti dell'hPRL potrebbero essere utilizzati in combinazione con la chemioterapia per migliorare la risposta chemioterapica.

## Discussione

Il trattamento efficace del CE in fase avanzata rimane una delle principali sfide in oncologia ginecologica. Il trattamento del CE in stadio avanzato generalmente prevede un intervento chirurgico con chemioterapia adiuvante (3, 46). Sebbene l'uso della chemioterapia adiuvante migliori la sopravvivenza libera da progressione dei pazienti con CE avanzata e ricorrente, la sopravvivenza globale di questi pazienti rimane invariabilmente scarsa (46). L'identificazione di nuovi bersagli per potenziali terapie mirate che possono essere utilizzate in combinazione con la terapia esistente probabilmente migliorerà la sopravvivenza e ridurrà gli effetti collaterali chemioterapici nei pazienti con CE in stadio avanzato (47).

Diversi studi hanno costantemente mostrato un aumento dell'espressione di hPRL nei campioni di carcinoma endometriale rispetto ai normali controlli endometriali (5, 12, 13). Abbiamo precedentemente osservato una bassa espressione di hPRL nell'endometrio normale, che era aumentata in modo graduale nei tessuti endometriali iperplastici e nel carcinoma endometriale, rispettivamente (12). Inoltre, è stato riportato un livello elevato di hPRL sierico in pazienti con carcinoma dell'endometrio rispetto ai controlli sani (5). Inoltre, è stato segnalato che l'aumento dei livelli sierici di hPRL è il più forte biomarcatore diagnostico del cancro dell'endometrio, con elevata sensibilità e selettività (13). Abbiamo inoltre fornito prove funzionali del coinvolgimento dell'hPRL autocrino nella progressione della CE. Abbiamo osservato che l'hPRL autocrino promuove la proliferazione e la sopravvivenza cellulare e migliora le capacità invasive e metastatiche delle cellule CE in vitro e in vivo. È stato precedentemente dimostrato che l'hPRL esogena stimola la proliferazione e inibisce l'apoptosi indotta dal cisplatino delle cellule di cancro dell'endometrio e dell'ovaio (5). Inoltre, lo stesso studio ha dimostrato che il trattamento cronico con hPRL promuove la trasformazione oncogenica del fibroblasto endometriale immortalizzato e delle cellule epiteliali ovariche normali (5). Il nostro precedente studio ha riportato che l'espressione dell'hPRL tumorale è correlata alla stadiazione definita della Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia e all'invasione miometriale nel carcinoma endometriale (12). Inoltre, abbiamo osservato che hPRL da solo o combinato con hGH predice esiti di sopravvivenza peggiori per i pazienti con CE o carcinoma mammario (12). Elevati livelli sierici di hPRL sono stati rilevati in pazienti con CE, suggerendo il potenziale di hPRL come biomarcatore diagnostico (5, 13). Oltre al cancro dell'endometrio, l'hPRL autocrino ha dimostrato di promuovere la sopravvivenza e la migrazione delle cellule del cancro ovarico e gli antagonisti del recettore della prolattina (PRLR) hanno dimostrato effetti inibitori sulla sopravvivenza e migrazione cellulare, indicativi di un potenziale effetto terapeutico degli antagonisti della PRLR nel cancro ovarico (48). Inoltre, è stato riportato che un pannello di quattro biomarcatori sierici, incluso hPRL, mostra una migliore prevedibilità nella diagnosi del carcinoma ovarico epiteliale in fase iniziale (10). Oltre ai tumori ginecologici, diversi studi hanno sostenuto un ruolo oncogeno dell'hPRL nel cancro al seno. Abbiamo precedentemente dimostrato che il PRLR, che è sovraregolato da HOXA1, media l'oncogenicità stimolata da HOXA1 nelle cellule di carcinoma mammario (49). Diversi studi recenti hanno fornito prove del ruolo funzionale dell'hPRL nel promuovere l'invasione e la migrazione delle cellule del cancro al seno. È stato riportato che hPRL regola il rimodellamento del citoscheletro di actina delle cellule migliorando così la migrazione delle cellule del cancro al seno (50). Un altro gruppo ha mostrato che motilità e l'invasione delle cellule del cancro al seno è mediata da hPRL (51, 52, 53, 54). È stato dimostrato che il blocco specifico dell'isoforma lunga del PRLR inibisce la diffusione metastatica del cancro al seno, oltre a promuovere l'apoptosi della popolazione di cellule staminali del cancro, che potrebbe essere coinvolta nel processo metastatico (55). Inoltre, è stato riportato che hPRL mostra un effetto protettivo contro l'apoptosi stimolata da ceramide C2 nelle linee cellulari di cancro al seno (56). Queste osservazioni sono state supportate da una recente meta-analisi che ha riportato un'associazione tra il livello plasmatico di hPRL e un aumento del rischio di carcinoma mammario postmenopausale, positivo per il recettore degli estrogeni/recettore del progesterone in situ e invasivo (57). Inoltre, è stata segnalata anche un'associazione di iperprolattinemia con aumento delle dimensioni del tumore, stadio di malattia più elevato, coinvolgimento dei linfonodi,

prognosi peggiore e maggior rischio di recidiva e mortalità nel cancro al seno (58). Nel carcinoma epatocellulare, è stato dimostrato che l'espressione di hPRL è sovraregolata e correlata positivamente con le dimensioni del tumore, il grado e la sopravvivenza più scarsa (9). Lo stesso studio ha anche dimostrato che l'hPRL aumenta l'oncogenicità delle linee cellulari di carcinoma epatocellulare (9).

Oltre ad aumentare l'oncogenicità delle cellule CE, abbiamo dimostrato che l'hPRL autocrino riduce la sensibilità delle cellule di CE alla doxorubicina e al paclitaxel sia in vitro che in vivo. È stato precedentemente osservato che hPRL protegge le cellule del CE dall'apoptosi stimolata dal cisplatino (5). hPRL è stato costantemente associato a ridotta chemiosensibilità in altri tumori (15-17). L'hPRL somministrato esogenamente ha ridotto la sensibilità delle cellule del cancro al seno a diversi agenti chemioterapici, tra cui cisplatino, doxorubicina, taxolo e vinblastina (18).

Un altro meccanismo proposto di chemioresistenza stimolato da hPRL coinvolge la modulazione dei livelli delle proteine della famiglia indicate con la siglia BCL-2 che regolano sia la vita che la morte delle cellule, hanno quindi un effetto pro e anti apoptotico (17, 18). Il trattamento con hPRL ha aumentato i livelli di BCL-2 con effetti antiapoptotico (aumentando la sopravvivenza) e ha diminuito i livelli di BAX proapoptotico (sfavorendo la morte cellulare) nelle cellule del cancro al seno. L'antagonista hPRL hPRL-G129R ha aumentato il rapporto BAX/BCL-2 (50, 60, 61), quindi favorendo la morte cellulare e sfavorendo la sopravvivenza cellulare. Nel nostro studio, la sintesi di BCL-2 è stata notevolmente aumentata dall'espressione forzata di hPRL autocrino nelle cellule del CE. Allo stesso modo, hPRL ha inibito l'apoptosi stimolata da cisplatino nelle cellule di carcinoma ovarico (62). Inoltre, è stato dimostrato che un antagonista hPRL o un antagonista PRLR agisce in sinergia con agenti chemioterapici per indurre l'apoptosi delle cellule del cancro al seno (63, 64). Clinicamente, livelli sierici di hPRL più elevati sono stati associati a una risposta più scarsa al docetaxel (Taxotere) (65) e il farmaco antiprolattinamico bromocriptina ha aumentato l'efficacia del docetaxel (Taxotere) nei pazienti con carcinoma mammario metastatico (19).

CD24 è un gene regolato da hPRL (28) e la sua espressione è stata aumentata nelle cellule di CE con espressione forzata di hPRL. Abbiamo precedentemente riportato che un altro fattore di crescita, l'artemina, ha aumentato l'oncogenicità e ridotto la chemiosensibilità delle cellule CE in modo CD24-dipendente (4). Inoltre, le cellule CE CD24-positive hanno mostrato una maggiore resistenza al cisplatino rispetto alle loro controparti CD24-negative sia in vitro che in vivo (66). È stato dimostrato che il CD24 è coinvolto nell'aumento dell'efflusso del farmaco e della chemioresistenza delle cellule EC (66). Nel presente studio, abbiamo inoltre osservato che la diminuzione indotta da hPRL della chemiosensibilità delle cellule EC è dipendente da CD24. Diversi geni la cui espressione porta a progressione del ciclo cellulare, geni antiapoptotici, e molecole di trasduzione del segnale, sono aumentati nella loro espressione da l'espressione forzata di CD24 nelle cellule del CE, che è stata anche sovraregolata dall'espressione forzata di hPRL nelle cellule EC (12). Allo stesso modo, nel carcinoma mammario, è stata riportata una correlazione negativa tra l'espressione del CD24 e il tasso di risposta patologica alla chemioterapia neoadiuvante (67). Un altro studio ha analogamente riportato che il fenotipo CD24-negativo è associato a una migliore sopravvivenza in pazienti con carcinoma mammario duttale invasivo trattati con antracicline e/o taxani (68). Inoltre, nel carcinoma epatocellulare, l'espressione di CD24 è sovraregolata nei tumori chemioresistenti e le cellule di carcinoma epatocellulare CD24+ sono associate alle cellule staminali del cancro epatico (69). Allo stesso modo, le cellule tumorali ovariche CD24+, che possiedono proprietà simili alle cellule staminali tumorali, hanno mostrato resistenza ai farmaci antitumorali cisplatino e doxorubicina (27).

In conclusione, i nostri risultati indicano che l'hPRL autocrino svolge un ruolo importante nella progressione e nelle metastasi della CE e riduce l'efficacia degli agenti chemioterapici nella CE. Pertanto, il target del segnale PRL/PRLR combinato con la chemioterapia può potenzialmente migliorare la risposta chemioterapica e costituirebbe un regime terapeutico nel trattamento della CE

in fase avanzata. Gli inibitori della segnalazione PRL/PRLR come gli antagonisti hPRLR (G129R-hPRL) e  $\Delta 1-9$ -G129R-hPRL (70) o un anticorpo monoclonale contro hPRLR (LFA102) (71) potrebbero essere considerati come terapia adiuvante praticabile nella CE in stadio avanzato (72).