

Titolo: “I tunnel di nanotubi indotti dalla chemioterapia mediano l'efflusso di farmaci intercellulari nel cancro del pancreas - Chemotherapy-Induced Tunneling Nanotubes Mediate Intercellular Drug Efflux in Pancreatic Cancer”

Codice: MUT010

Autore: Desir et al.

Data: 2018

Rivista: Scientific reports 21;8(1):9484

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27649-x>

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27649-x>

BLOG: <https://www.metodidibellaevidenzescientifiche.com/mut010-desir-et-al-2018/>

Parole chiave: tunnel nanotubi, trasferimento intercellulare, chemioresistenza, efflusso di farmaci

Tumore: cancro al pancreas, cancro ovarico

Traduzione: Tradotte in modo fedele le sezioni “Riassunto”, “Contesto” e “Discussione”. Della sezione “Risultati” presentati solo i titoli dei paragrafi.

Punti di interesse:

In questo studio in vitro su linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico e ovarico è stata studiata la formazione di tunnel di nanotubi (TNT) in risposta a concentrazioni variabili del farmaco chemioterapico doxorubicina, che è ampiamente utilizzato nel trattamento dei pazienti oncologici. La doxorubicina ha stimolato una maggiore formazione di TNT nelle cellule tumorali del pancreas e ciò si è verificato in modo dose-dipendente. Inoltre, i TNT hanno facilitato la ridistribuzione intercellulare del chemioterapico tra le cellule collegate nei sistemi di cancro del pancreas e dell'ovaio. La formazione di TNT è stata sovraregolata nelle forme aggressive di carcinoma pancreatico, è stata ulteriormente stimolata dopo l'esposizione alla chemioterapia e ha agito come un nuovo metodo per l'efflusso di farmaci. Questi risultati implicano i TNT come un potenziale nuovo meccanismo di resistenza ai farmaci.

Altri tipi di tumore per i quali gli autori hanno riportato risultati simili includono carcinomi polmonari, carcinomi ovarici, osteosarcomi, carcinomi mammari, tumori neuroendocrini e tumori del colon. Lo studio supporta l'idea che i TNT rappresentino una risposta allo stress intercellulare non genetica mediante la quale i tumori possono sopravvivere nonostante l'esposizione a farmaci chemioterapici citotossici in un microambiente tumorale ipossico. I risultati di questo studio e di altri studi indicano che i fattori di stress fisiologici o metabolici nel microambiente tumorale possono indurre o attivare anche altre forme di sporgenze cellulari, tra cui l'invadopodia responsabile della migrazione invasiva delle cellule tumorali.

Sulla base di questi e dei altri risultati, gli autori ipotizzano che la capacità dei TNT di formarsi in risposta allo stress indotto da farmaci chemioterapici o altri interventi non farmacologici possa spiegare l'emergenza precoce della resistenza ai farmaci. Inoltre, la capacità dei TNT di mediare l'efflusso intercellulare, o la redistribuzione, dei farmaci - potenzialmente a livelli subterapeutici - può consentire alle cellule collegate tramite queste "reti" cellulari di proteggersi a vicenda dalla suscettibilità ai farmaci. In questo potenziale modello, con la somministrazione continua della chemioterapia nel tempo, le cellule che si adattano meglio allo stress chemioterapico sopravviverebbero.

Riassunto

La comunicazione intercellulare gioca un ruolo fondamentale nel panorama in continua evoluzione dei tumori invasivi. Studi recenti hanno chiarito il ruolo potenziale dei tunnel di nanotubi (TNT) in questa funzione. I TNT sono protrusioni cellulari lunghe, filamentose e a base di actina che mediano la comunicazione diretta da cellula a cellula tra le cellule maligne. In questo studio, abbiamo studiato la formazione di TNT in risposta a concentrazioni variabili del farmaco chemioterapico doxorubicina, che è ampiamente utilizzato nel trattamento dei pazienti oncologici. La doxorubicina ha stimolato una maggiore formazione di TNT nelle cellule tumorali del pancreas e ciò si è verificato in modo dose-dipendente. Inoltre, i TNT hanno facilitato la redistribuzione intercellulare di questo farmaco tra le cellule collegate nei sistemi di cancro del pancreas e dell'ovaio in vitro. Per fornire prove a sostegno della rilevanza dei TNT nel cancro del pancreas in vivo, abbiamo eseguito microscopia a fluorescenza multifotonica e immagini di TNT in campioni di tumore resecati da tre pazienti umani con adenocarcinoma pancreatico e uno con carcinoma neuroendocrino. In sintesi, la formazione di TNT è stata sovraregolata nelle forme aggressive di carcinoma pancreatico, è stata ulteriormente stimolata dopo l'esposizione alla chemioterapia e ha agito come un nuovo metodo per l'efflusso di farmaci. Questi risultati implicano i TNT come un potenziale nuovo meccanismo di resistenza ai farmaci nelle forme di cancro chemiofrattarie.

Introduzione

Le cellule tumorali sono, in parte, caratterizzate dalla loro capacità di invasione. Risiedono in un contesto di microambienti tumorali eterogenei e ricchi di stroma. Il concetto di eterogeneità del tumore alla farmacoresistenza nel trattamento del cancro è ben consolidato (1). Questa proprietà include l'eterogeneità all'interno dello stesso tipo di cancro tra i pazienti, l'eterogeneità intertumorale tra diversi tumori (primari o metastatici) all'interno dello stesso paziente e l'eterogeneità intratumorale all'interno di un dato singolo tumore. La proporzione tumore-stroma può variare ampiamente e correlare con la prognosi del paziente (2, 3, 4). La relazione e l'interazione tra cellule maligne e stromali è dinamica e in costante flusso, poiché le cellule tumorali reagiscono e rispondono ai fattori di stress metabolici e fisiologici l'una dall'altra e dall'ambiente circostante.

La comunicazione intercellulare ha guadagnato crescente attenzione come fattore critico per indurre eterogeneità nei microambienti tumorali. È da tempo noto che gli effetti del trasferimento diretto da cellula a cellula di segnali (tramite trasferimento orizzontale) si verificano tramite segnali solubili come chemochine e citochine. Più recentemente, sono stati studiati tramite canali cellulari o vettori come giunzioni gap e vescicole extracellulari (EV), inclusi esosomi e microvescicole. Queste

modalità fisiche di comunicazione cellulare sono responsabili della trasmissione di segnali chiave di proliferazione e crescita cellulare che consentono la progressione del tumore. Inoltre, la loro espressione sembra essere modulata in risposta a segnali esterni, inclusa l'esposizione a farmaci somministrati con intento terapeutico.

Una forma relativamente nuova di comunicazione intercellulare nota come tunnel di nanotubi (TNTs) rappresenta un'aggiunta al quadro dei meccanismi fisici di segnalazione cellulare (5, 6). Queste strutture sono lunghe e sottili (50–1000 nm di larghezza) protrusioni cellulari a base di F-actina, che consentono alle cellule collegate da TNT di eseguire un trasferimento efficiente e diretto da cellula a cellula di segnali citoplasmatici, inclusi mitocondri, microRNA e altri componenti (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30). I TNT sono sovraregolati nelle forme invasive di cancro rispetto alle cellule stromali o non maligne (19, 31) e sono indotti in vitro dopo l'esposizione a forme di stress metabolico o fisiologico, tra cui deprivazione di siero, ipossia, iperglicemia e perossido di idrogeno (19, 32, 33, 34). Abbiamo ipotizzato che i TNT possano essere ulteriormente sovraregolati dopo l'esposizione a farmaci chemioterapici e possano rappresentare una forma unica di risposta allo stress cellulare che consente alle cellule di ridistribuire i farmaci, riducendo così il tasso di uccisione complessivo delle cellule tumorali. Qui, presentiamo i dati che dimostrano la formazione variabile di TNT dopo l'esposizione all'agente chemioterapico antracicline, la doxorubicina, in modelli di cancro del pancreas e dell'ovaio ed esaminiamo gli effetti della ridistribuzione intercellulare della doxorubicina tramite i TNT. I nostri risultati mostrano che i TNT hanno la capacità di ridistribuire efficacemente un farmaco chemioterapico. Tale ridistribuzione tramite TNT potrebbe essere un potenziale meccanismo per l'emergere della resistenza ai farmaci chemioterapici nel cancro.

Risultati

- 1) I TNT possono essere visualizzati in tumori pancreatici maligni intatti resecati da pazienti umani: prove a sostegno che i TNT sono un fenomeno in vivo
- 2) Le cellule dell'adenocarcinoma pancreatico formano più TNT rispetto all'epitelio duttale pancreatico
- 3) I TNT si formano in modo dose-dipendente dopo l'esposizione alla doxorubicina
- 4) I TNT facilitano la ridistribuzione/efflusso intercellulare di doxorubicina tra cellule tumorali chemioresistenti e chemiosensibili

Discussione

La chemioresistenza rimane un problema clinico significativo, ma i meccanismi cellulari sottostanti rimangono poco chiari nonostante i progressi nel campo del trattamento del cancro. I nostri studi sono stati progettati per valutare la formazione di TNT, una forma unica di protrusione cellulare implicata nella comunicazione cellulare a lunga distanza, come risposta allo stress cellulare. Abbiamo scoperto che la risposta dopo l'esposizione delle cellule tumorali del pancreas alla doxorubicina era dose-dipendente e che i TNT facilitano una nuova e diretta forma di efflusso di farmaci da cellula a cellula tra le cellule tumorali del pancreas e dell'ovaio attraverso il trasporto di un farmaco citotossico (doxorubicina). A nostra conoscenza, il trasferimento diretto da cellula a cellula e l'efflusso di agenti chemioterapici tramite TNT è stato riportato in un altro caso, in un modello in vitro di leucemia mieloide acuta. In quello studio, i ricercatori hanno rilevato la localizzazione del farmaco daunorubicina nei lisosomi e visualizzato il trasferimento da cellula a

cellula del farmaco tramite i TNT (50). Nel 2012, abbiamo riportato che i TNT, o almeno le strutture simili a TNT, potevano essere visualizzati connettendo cellule in tumori intatti resecati da pazienti umani con mesotelioma pleurico maligno (19, 31). Altri tipi di tumore per i quali abbiamo riportato risultati simili includono carcinomi polmonari, carcinomi ovarici, osteosarcomi, carcinomi mammari, tumori neuroendocrini e tumori del colon (19, 32, 47, 51). Qui, forniamo prove visive che gli adenocarcinomi pancreatici e i carcinomi neuroendocrini possono essere aggiunti a questo elenco crescente di tipi di cancro aggressivi che sono in grado di formare TNT per mediare la comunicazione intercellulare a lungo raggio in vivo. Il rilevamento di TNT, o strutture simili a TNT, in questo contesto supporta ulteriormente l'idea che i risultati in vitro riportati in questo documento abbiano una potenziale rilevanza clinica.

Abbiamo utilizzato la doxorubicina, un farmaco chemioterapico a base di antracicline in ampio uso clinico per una varietà di neoplasie epiteliali, inclusi tumori della mammella e delle ovaie, a causa del suo ampio utilizzo nel trattamento basato sulla chemioterapia del cancro e delle proprietà autofluorescenti in vitro (49). Il suo meccanismo d'azione principale coinvolge l'intercalazione del DNA e l'inibizione della topoisomerasi. Le nostre osservazioni sottolineano un possibile ruolo dei TNT nell'efflusso di farmaci di tumori. Abbiamo esposto le cellule a varie concentrazioni di questo farmaco (200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 ng/mL) e confrontato i risultati con nessun farmaco. In ambito clinico, la doxorubicina segue una fase di distribuzione rapida seguita da una fase di lenta eliminazione; il farmaco raggiunge una concentrazione massima di ~600 ng/ml prima di essere distribuito ad altri tessuti dopo somministrazione endovenosa (52, 53). L'aggiunta di una concentrazione ottimizzata del farmaco (abbastanza bassa da non indurre una tossicità immediata che porta alla morte cellulare, ma sufficientemente alta da essere rilevata utilizzando la microscopia a fluorescenza) ci ha permesso di eseguire l'imaging time-lapse nell'arco di 24-48 ore. Abbiamo visualizzato la crescita diretta dei TNT da cellule chemioresistenti (SKOV3) trattate con farmaci a cellule di cancro ovarico chemiosensibili (A200), confermando che le cellule resistenti erano in grado di avviare questa forma unica di interazione cellulare. Dopo la co-coltura di cellule SKOV3 trattate con doxorubicina con cellule A2780, abbiamo visualizzato un TNT che collega queste cellule e facilita il trasferimento di una quantità minima di questo farmaco autofluorescente. In poche ore, la cellula ricevente chemiosensibile (A2780) si è involuta e ha subito la morte cellulare.

Come abbiamo riportato in precedenza, quando queste cellule sono state co-coltivate, la formazione di TNT da cellule di cancro ovarico chemioresistenti a chemiosensibili costituiva il minor numero di interazioni, rispetto a sensibili a resistenti, resistenti a resistenti o sensibili a -sensibile (32). La scoperta che un farmaco può essere ridistribuito tramite TNT pone un potenziale nuovo paradigma per i meccanismi cellulari di efflusso di farmaci e lo sviluppo della resistenza ai farmaci nei tumori. Ipotizziamo che questa scoperta suggerisca che i TNT possano fungere da meccanismo alternativo in grado di esportare farmaci chemioterapici in modo efficiente tra cellule collegate.

Nel 2013 abbiamo pubblicato una revisione del potenziale impatto della comunicazione intercellulare sull'eterogeneità del tumore nel cancro del pancreas (54). A quel tempo, abbiamo ipotizzato il ruolo che i TNT potrebbero svolgere nelle interazioni tumore-tumore in questo microambiente tumorale particolarmente eterogeneo. Il nostro attuale studio supporta l'idea che i TNT rappresentino una risposta allo stress intercellulare non genetica mediante la quale i tumori possono sopravvivere nonostante l'esposizione a farmaci chemioterapici citotossici in un microambiente tumorale ipossico. Nel 2015 Ware et al. hanno riportato una

scoperta simile di formazione di TNT sovraregolata tra cellule pancreatiche maligne a seguito di una diversa modalità terapeutica (ablazione con radiofrequenza; RFA) (55). Nell'esaminare la percentuale di cellule che formano TNT prima e dopo l'RFA, i ricercatori hanno scoperto un aumento significativo della formazione di TNT nelle cellule maligne PANC-1 e AsPc-1 e, come nel nostro caso, hanno proposto questa azione come risposta allo stress in seguito a quella forma di trattamento. È interessante notare che anche loro hanno utilizzato HPDE come confronto non maligno e la percentuale di cellule che formano TNT era relativamente trascurabile sia prima che dopo il trattamento RF (55). I risultati di entrambi gli studi supportano l'idea che i fattori di stress fisiologici o metabolici nel microambiente possono indurre o attivare anche altre forme di sporgenze cellulari, tra cui l'invadopodia responsabile della migrazione invasiva delle cellule tumorali (56). Sulla base di questi e dei nostri risultati, ipotizziamo che la capacità dei TNT di formarsi in risposta allo stress indotto da farmaci chemioterapici o altri interventi non farmacologici possa, almeno in parte, spiegare l'emergenza precoce della resistenza ai farmaci. Inoltre, la capacità dei TNT di mediare l'efflusso intercellulare, o la redistribuzione, dei farmaci - potenzialmente a livelli subterapeutici - può consentire alle cellule collegate tramite queste "reti" cellulari di proteggersi a vicenda dalla suscettibilità ai farmaci. In questo potenziale modello, con la somministrazione continua della chemioterapia nel tempo, le cellule che si adattano meglio allo stress chemioterapico sopravviverebbero e supererebbero altre sottopopolazioni clonali. L'evoluzione dell'efflusso di farmaci nelle cellule tumorali è già conosciuta, poiché lo sviluppo della chemioresistenza tramite la sovraespressione della glicoproteina P (P-gp) è già ben stabilito (57). Questa proteina è un membro della famiglia dei trasportatori ABC; quando è sovraespressa, si incorpora nella membrana plasmatica, fungendo efficacemente da pompa per l'efflusso di agenti chemioterapici (58,59). È stato anche dimostrato il potenziale per il trasferimento intercellulare di questa proteina per il mantenimento della sua funzionalità (18, 60). Inoltre, questa pompa è stata studiata nel contesto dei TNT, e in particolare nel cancro ovarico (61). Il trasferimento mediato da TNT di mitocondri e P-gp è stato dimostrato nelle linee cellulari di cancro al seno e alle ovaie, oltre al trasferimento mediato senza contatto cellula-cellula tramite microparticelle; questo trasferimento è stato associato alla chemioresistenza (18,45,61). Diversi studi recenti hanno infatti confermato il trasporto da cellula a cellula di farmaci chemioterapici attraverso microparticelle cellulari o esosomi (62). Rispetto ai TNT, gli esosomi sono navi diffusibili di trasporto cellulare ma potrebbero non essere efficienti per la consegna del carico come i TNT, che fungono da condutture su nanoscala tra cellule distanti che non possono essere collegate tramite altre forme di connessione (giunzione gap). I nostri risultati supportano l'idea che i TNT rappresentino un meccanismo recentemente identificato di efflusso di farmaco, che comprende sia l'estrusione di farmaco da citoplasma a citoplasma tramite TNT. Il trasferimento intercellulare di P-gp è stato esaminato in altri modelli di cancro (ad esempio, nel cancro della vescica); almeno uno studio ha concluso che il contatto cellula-cellula non è necessario affinché questo trasferimento avvenga e media la resistenza ai farmaci (63). Gli autori hanno concluso che le microparticelle erano la modalità di trasferimento più probabile in quello studio. In questo contesto, il trasferimento mediato da TNT di P-gp può svolgere un ruolo più complementare o secondario all'estrusione del citoplasma nell'ambiente extracellulare tramite i canali P-gp/resistenza multifarmaco (MDR).

Abbiamo dimostrato che la formazione di TNT è significativamente più alta nelle cellule pancreatiche maligne rispetto alle cellule epiteliali duttali pancreatiche (non maligne). Questo risultato e la differenza nei TNT tra cellule maligne e benigne è coerente con i nostri dati in altri tumori invasivi, come il mesotelioma pleurico maligno, tra gli altri (31). In precedenza abbiamo ipotizzato che i TNT svolgano un ruolo nei tumori che potrebbero permetterci di sfruttarli come condotti per una somministrazione di farmaci più efficace (51, 61).

Questo concetto sarebbe particolarmente intrigante e applicabile al cancro del pancreas, in cui un'efficace penetrazione dei farmaci rimane una sfida a causa della densa reazione desmoplastica e degli spessi strati di acido ialuronico che precludono la diffusione dei farmaci nei tumori (54, 62). Qui, abbiamo scoperto che la lunghezza dei TNT era notevolmente molto più lunga nelle linee cellulari di cancro del pancreas coltivate in vitro, rispetto alle loro controparti all'interno dei tumori umani. Ipotizziamo che questo risultato sia dovuto all'entità di questa densità stromale in vivo.

È interessante notare che i TNT hanno dimostrato di fornire il salvataggio delle cellule staminali mesenchimali dei cardiomiociti danneggiati dopo l'esposizione a farmaci antracicline dal trasferimento dei mitocondri mediato da TNT (64). Nel contesto del cancro, gli effetti possono effettivamente essere invertiti, in cui il danno chemioterapico e il conseguente aumento della formazione di TNT porta alla redistribuzione del farmaco ad altre cellule - nel tentativo delle cellule colpite di salvarsi - o indurre una risposta allo stress che porta le cellule danneggiate a "offrire" i loro mitocondri e altri componenti cellulari vitali ad altre cellule vicine come "sacrificio" a beneficio della popolazione complessiva di cellule tumorali. La nicchia dei TNT e della somministrazione di farmaci è stimolante e prevediamo guadagnerà un maggiore interesse.

In sintesi, la formazione di TNT come risposta all'esposizione a farmaci chemioterapici è dose-dipendente, con il più alto tasso di formazione che si verifica a concentrazioni fisiologicamente rilevanti. Questa risposta differenziale rappresenta una potenziale risposta allo stress cellulare che facilita l'aumento dei tassi di comunicazione intercellulare mediata da TNT e il trasferimento di farmaci citotossici, come la doxorubicina. Postuliamo che questa nuova forma di efflusso di farmaci a lungo raggio redistribuisca questi farmaci e possa o meno provocare la morte cellulare delle cellule riceventi chemiosensibili. Questo studio fornisce informazioni preliminari sul potenziale ruolo fisiopatologico dei TNT nel facilitare la redistribuzione dei farmaci e la loro formazione come risposta allo stress, e dovrà essere motivato attraverso ulteriori indagini approfondite. In questo contesto, i TNT possono fornire un potenziale nuovo e aggiuntivo meccanismo mediante il quale le cellule propagano la chemioresistenza ai farmaci nei tumori invasivi.