

Titolo: Esosomi nel microambiente sano e maligno del midollo osseo - Exosomes in the Healthy and Malignant Bone Marrow Microenvironment

Codice: MUT006

Autore: Moore et al .

Data: 2021

Rivista: In: Banerjee D., Tiwari R.K. (eds) Tumor Microenvironment: Cellular, Metabolic and Immunologic Interactions. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1350:67-89. Springer, Cham

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: no

DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-83282-7_3

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34888844/>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2022/02/16/mut006-moore-et-al-2021/>

Parole chiave: midollo osseo, cancro, esosomi, micromambiente, terapie

Tumore: n/a

Traduzione: tutto l'articolo è stato tradotto ma con semplificazioni

Punti di interesse

Il sistema ematopoietico (l'insieme degli organi e dei tessuti in cui avviene la produzione degli elementi corpuscolari del sangue come globuli rossi, cellule del sistema immunitario, piastrine) nell'adulto è localizzato principalmente nel midollo osseo (BM – bone marrow in inglese). Il midollo osseo è contenuto all'interno della cavità centrale delle ossa lunghe e assiali, come femore, tibia, costole, e degli spazi intra-trabecolari delle ossa spugnose. Nella midollo osseo sano, le cellule staminali ematopoietiche (HSC – hemopoietic stem cells) sono le cellule più primitive all'interno della gerarchia delle cellule del sangue, e sono quelle che danno origine a tutte le altre. Per tutta la vita di un individuo, le HSC sono la fonte delle cellule del sangue e delle cellule immunitarie. Il processo di differenziazione è regolato dalle cellule del microambiente del midollo osseo, tramite segnali molecolari e ambientali. Il microambiente del midollo osseo (BMM – microenvironment of bone marrow) include le cellule ematopoietiche, cellule che comprendono il compartimento stromale del midollo osseo come le cellule endoteliali, cellule osteolineari, adipociti, neuroni, cellule staminali mesenchimali (MSC), macrofagi e megacariociti, matrice extracellulare e fattori secreti, indicati nell'insieme con il termine “secretoma”.

Il destino delle HSC (dormienza o proliferazione) dipende dall'interazione con il microambiente del midollo osseo, ovvero dipende dalla comunicazione tra i vari elementi che lo compongono. Il destino delle cellule staminali ematopoietiche è definito in porzioni precise del midollo osseo, chiamate nicchie, con distinte caratteristiche cellulari e fisiche. Due nicchie sarebbero fondamentali per il destino delle cellule staminali ematopoietiche: la nicchia endostale e la nicchia perivascolare.

Nella nicchia endostale le cellule staminali ematopoietiche sono in stretto contatto con l'endostio (sottile lamina di cellule che riveste le cavità midollari sia nelle diafisi delle ossa lunghe sia nell'osso spugnoso). Vari studi forniscono prove che la nicchia endossea sia il sito per il mantenimento a lungo termine delle cellule staminali ematopoietiche quiescenti. La nicchia perivascolare del midollo osseo è la regione che circonda le arteriole e i seni, l'intersezione tra la circolazione sistemica e la cavità del midollo osseo. La nicchia vascolare è considerata l'area di proliferazione e auto-rinnovamento di queste cellule. Le HSC di questa nicchia sono generalmente considerate "attive" e predisposte alla differenziazione poiché sono convenientemente localizzate per la mobilitazione nel flusso sanguigno.

Microambiente e cellule staminali del cancro

Ci sono prove crescenti che suggeriscono una relazione intricata tra le cellule tumorali e le cellule native del microambiente del midollo osseo. Le cellule tumorali sono in grado di appropriarsi dei meccanismi consolidati utilizzati dal midollo osseo per supportare le cellule staminali ematopoietiche sane per promuovere la propria sopravvivenza. Ad esempio, è stato dimostrato che le cellule leucemiche dirottano il secretoma del midollo osseo per indurre la progressione e la resistenza alla terapia. Nel cancro al seno metastatico al midollo osseo, è stato segnalato che anche le cellule del cancro al seno disseminate (BCC) dirottano il microambiente del midollo osseo, che può indurre in queste cellule un fenotipo dormiente, caratterizzato da quiescenza del ciclo cellulare e chemioresistenza. Adottando questo fenotipo dormiente, le cellule metastatiche del cancro al seno possono eludere il sistema immunitario e persistere nel midollo per decenni, per poi riattivarsi. Queste cellule tumorali dormienti agiscono come cellule staminali che esibiscono capacità di auto-rinnovamento, resistono ai trattamenti convenzionali ed esprimono tipici marcatori di cellule staminali. Nel compartimento ematopoietico, le cellule staminali del cancro sfruttano le risorse utilizzate dalle cellule staminali ematopoietiche.

Vie di comunicazione nel microambiente del midollo osseo

C'è un'immensa quantità di comunicazione cellula-cellula all'interno del microambiente del midollo osseo che regola il destino cellulare. La comunicazione può essere diretta, tramite ad esempio, giunzione gap, molecole di adesione, o tramite interazioni indirette, tramite quindi il secretoma. Il "secretoma" comprende tutti i fattori solubili (citochine, fattori di crescita, peptidi neuronali, ormoni, e insolubili (vescicole extracellulari, esosomi) rilasciati dalle cellule. Sebbene tutte le modalità di comunicazione siano vitali per il corretto funzionamento, il secretoma, e in particolare le sue microvescicole, sta emergendo come un attore critico nella regolazione ematopoietica. Le microvescicole sono particelle delimitate da doppio strato lipidico rilasciate dalle cellule che fungono da mezzo di comunicazione intercellulare indiretta fondendosi e incorporandosi con le cellule vicine. Esistono varie classi di vescicole extracellulari, comprese le microvescicole, i corpi apoptotici e gli esosomi. Ciascuna sottocategoria si distingue in base alle dimensioni e ai marcatori legati alla membrana. Gli esosomi hanno un diametro compreso tra 30 e 150 nm ed esprimono diversi marcatori di membrana.

Biogenesi degli esosomi

Rispetto ad altre sottoclassi di vescicole extracellulari, gli esosomi hanno origine da un endosoma

(vescicola che si forma per invaginazione della membrana cellulare verso l'interno della cellula). I corpi multivescicolari sono un tipo di endosomi che contengono porzioni interiorizzate della membrana limitante che formando "vescicole intraluminali", vescicole all'interno dell'endosoma. I corpi multivescicolari vengono quindi trasportati alla membrana plasmatica (verso quindi la superficie della cellula) dove si fondono con essa e rilasciano le loro vescicole intraluminali nello spazio extracellulare sotto forma di esosomi.

Carico degli esosomi

Gli esosomi sono stati originariamente proposti come contenitori di rifiuti cellulari. Tuttavia, gli studi contemporanei hanno scoperto l'importante ruolo degli esosomi come corrieri intercellulari cruciali che consegnano messaggi attraverso contenuti molecolari distinti. È stato dimostrato che il contenuto di esosomi varia a seconda della cellula da cui vengono rilasciati. Contengono un'ampia varietà di proteine, lipidi, metaboliti e acidi nucleici, inclusi RNA messaggero (mRNA), microRNA (miRNA), RNA non codificanti (ncRNA), RNA circolare (cRNA) e DNA. I contenuti esosomiali cambiano a seconda delle condizioni di crescita, dei trattamenti e dei fattori esterni.

Gli esosomi vengono rapidamente assorbiti dalle cellule bersaglio. Una volta incorporati nella cellula bersaglio, gli esosomi regolano specifici percorsi a valle attraverso il loro carico molecolare, dando loro la capacità di modulare microambienti locali e distanti.

Esosomi e cancro

Nel contesto del cancro, gli esosomi svolgono un ruolo importante nella progressione del tumore e nella metastasi. Gli esosomi sono stati implicati nella formazione di nicchie premetastatiche e nel supporto della progressione del tumore attraverso la promozione dell'angiogenesi, la modulazione del sistema immunitario e il rimodellamento del tessuto parenchimale. Le cellule tumorali secernono esosomi che possono attivare recettori o modificare l'espressione di miRNA o RNA in cellule sane vicine che alterano i loro fenotipi biologici. Inoltre, è stato dimostrato che gli esosomi provenienti dalle cellule tumorali alterano la risposta immunitaria inattivando la proliferazione dei linfociti e delle cellule natural killer, innescando anche la risposta immunitaria per creare un microambiente infiammatorio. Durante la metastasi, le cellule tumorali rilasciano esosomi che hanno portato le cellule a subire la transizione epiteliale-to-mesenchimale (EMT).

Diversi studi evidenziano che sia nei tumori del sangue che nel tumore alla mammella metastatico al midollo osseo, gli esosomi hanno un ruolo importante nella comunicazione tra cellule tumorali e cellule del microambiente del midollo osseo. Le cellule del microambiente del midollo osseo come le cellule staminali mesenchimali, osteblasti, macrofagi, cellule endoteliali etc sono in grado tramite gli esosomi di comunicare con le cellule tumorali, ma anche le cellule tumorali tramite i loro esosomi possono istruire le cellule sane del microambiente del midollo osseo coinvolgendole nella progressione tumorale.

Terapie

Prove crescenti suggeriscono quindi che il microambiente del midollo osseo è coinvolto nello sviluppo del cancro attraverso mediatori intercellulari, come gli esosomi. Per questo si teorizza che i trattamenti attuali mancano di efficacia clinica a causa del ruolo del microambiente. I trattamenti attuali sono inefficaci perché non considerano gli scambi comunicativi tra cellule tumorali e microambiente. Pertanto, le strategie terapeutiche mirate alla produzione, secrezione e assorbimento

di esosomi possono essere una strada praticabile per migliorare l'efficacia terapeutica nei pazienti con tumori ematologici o al seno metastatici. Per rispondere a questa esigenza, numerosi studi preclinici e clinici in corso mirano a identificare percorsi associati agli esosomi, mirati e coinvolti nella progressione del cancro e nella resistenza alle terapie. Allo stesso modo, i ricercatori hanno anche tentato di sviluppare tecnologie per rimuovere gli esosomi patogeni. Inoltre, gli esosomi sono attraenti come veicoli per la consegna di farmaci grazie alle loro dimensioni su nanoscala e alla capacità di consegnare il loro carico alle cellule bersaglio. La somministrazione di farmaci e le strategie terapeutiche basate sugli esosomi sembrano promettenti, ma ci sono diversi problemi che devono essere affrontati prima di un'implementazione sicura ed efficace nell'ambiente clinico.

Purezza e abbondanza degli esosomi è fondamentale per lo sviluppo di terapie a base di esosomi, così come lo sviluppo di processi efficienti per caricare i farmaci negli esosomi, per massimizzare l'efficienza della produzione e della somministrazione degli agenti terapeutici.

Lo sviluppo e l'incorporazione di sistemi di colture cellulari tridimensionali (3D) in vitro nella ricerca biomedica preclinica, per sostituire le culture a due dimensioni, potrebbero essere vitali per migliorare la comprensione del tessuto midollare sia nella salute che nella malattia e per lo sviluppo di farmaci efficienti. Il fallimento degli studi clinici sui farmaci potrebbe essere superato con culture cellulari più simili a quelle in vivo. Culture cellulari a 3D imitano meglio la natura del tessuto nativo rispetto alla coltura bidimensionale (2D) e si potrebbero avere risposte cellulari più simili a quelle delle cellule in vivo.

Traduzione dell'articolo

Riassunto

Il midollo osseo (BM, bone marrow) è un organo complesso che sostiene l'emopoiesi attraverso meccanismi che coinvolgono il microambiente. Il microambiente comprende diversi tipi cellulari, neurotrasmettitori da fibre innervate, fattori di crescita, proteine della matrice extracellulare e vescicole extracellulari. La funzione principale del midollo osseo è quella di regolare la funzione ematopoietica per sostenere la produzione di sangue e cellule immunitarie. Tuttavia, il microambiente del midollo osseo può anche ospitare la sopravvivenza delle cellule maligne. Un importante meccanismo mediante il quale le cellule tumorali comunicano con le cellule del microambiente del midollo osseo è attraverso lo scambio di esosomi, un sottoinsieme di vescicole extracellulari che forniscono segnali molecolari in modo bidirezionale tra cellule maligne e sane. Il campo degli esosomi è un'area di ricerca attiva poiché si comprende come l'imballaggio, il carico e la produzione esosomiale possono essere sfruttati terapeuticamente per scoraggiare la progressione del cancro e sensibilizzare le cellule maligne ad altre terapie. Complessivamente, questo capitolo discute il ruolo cruciale degli esosomi nello sviluppo e nella progressione dei tumori associati al midollo osseo, come le neoplasie ematologiche e il carcinoma mammario metastatico. Vengono anche considerate le strategie terapeutiche basate sull'esosoma e i loro limiti.

Il microambiente del midollo osseo

Il sistema ematopoietico adulto è localizzato principalmente nel midollo osseo (BM). Il midollo osseo è contenuto all'interno della cavità centrale delle ossa lunghe e assiali (ad es. femore, tibia,

costole) e degli spazi intra-trabecolari delle ossa spugnose (1). Nella midollo osseo sano, le cellule staminali ematopoietiche (HSC – hemopoietic stem cells) sono le cellule più primitive all'interno della gerarchia ematopoietica. Per tutta la vita di un individuo, le HSC sono la fonte del sangue e delle cellule immunitarie. Il processo di differenziazione è regolato dalle cellule del microambiente del midollo osseo, tramite segnali molecolari e ambientali (2). Per sostenere questo processo a lungo termine, i numeri di HSC vengono mantenuti attraverso una divisione asimmetrica, consentendo a queste cellule di autorinnovarsi (3). In altri rapporti, sembra che le HSC garantiscano la loro sopravvivenza di una percentuale che rimane abbastanza dormiente a meno che non sia necessario per lo stress ematopoietico.

La nostra comprensione del sistema ematopoietico è notevolmente migliorata negli ultimi decenni, sulla base di nuovi studi che indicano che il destino cellulare potrebbe non essere così rigido come si credeva in precedenza e che ci sono diversi modi in cui il destino delle cellule staminali può essere regolato. Studi recenti rivelano un alto grado di interdipendenza tra HSC e il microambiente del midollo osseo (BMM – bone marrow microenvironment) (4-8).

Nel complesso, il microambiente del midollo osseo include le cellule ematopoietiche (p. es., HSC, progenitori ematopoietici), cellule che comprendono il compartimento stromale del midollo osseo (p. es., cellule endoteliali, cellule osteolineari, adipociti, neuroni simpatici, cellule di Schwann non mielinizzanti, cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule reticolari (CAR), macrofagi e megacariociti), matrice extracellulare e fattori secreti (p. es., secretoma). Il destino delle cellule staminali ematopoietiche è determinato da porzioni precise del microambiente del midollo osseo, note come "nicchie" che mostrano distinte composizioni cellulari e fisiche (9-11). Questo sistema altamente complesso determina il numero, la posizione, la proliferazione, la capacità di auto-rinnovamento e la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche. La relazione tra le principali nicchie del midollo osseo - endostale e perivascolare - e il mantenimento delle cellule ematopoietiche staminali viene brevemente esplorata nelle sezioni seguenti.

Nicchia endostale

È stato mostrato per la prima volta che le cellule staminali ematopoietiche (HSC) risiedono vicino alla superficie ossea, o nicchia endossea, nel 1975 (12). Rapporti successivi hanno dimostrato che le HSC sono in stretto contatto con l'endostio (cellule che rivestono la cavità ossea dove si trova il midollo osseo) e che questo contatto è responsabile della regolazione della proliferazione o meno delle HSC (13). Inoltre, la microscopia elettronica a scansione e l'istologia dell'osso di ratto aperto hanno fornito prove morfologiche della presenza di nicchie HSC in associazione con l'endostio (14). Vari studi forniscono prove inconfutabili della presenza di HSC dormienti non proliferative e di progenitori multipotenti nella regione endossea del midollo osseo, suggerendo che la nicchia endossea è il sito per il mantenimento a lungo termine delle cellule staminali ematopoietiche quiescenti (14, 15, 16).

Nicchia perivascolare

La nicchia perivascolare del midollo osseo è considerata la regione che circonda le arteriole e i seni, l'intersezione tra la circolazione sistemica e la cavità del midollo osseo (17). A causa del gran numero di HSC perivascolari, la nicchia vascolare è ampiamente considerata l'area di proliferazione e auto-rinnovamento delle HSC (18). Le HSC di questa nicchia sono generalmente considerate

“attive” o altamente proliferative e sono predisposte alla differenziazione poiché sono convenientemente localizzate per la successiva mobilitazione nel flusso sanguigno (19). Potrebbero tuttavia esserci anche nicchie vascolari distinte per HSC quiescenti e non quiescenti (20, 21).

Esosomi

C'è un'immensa quantità di comunicazione cellula-cellula all'interno del microambiente del midollo osseo che regola il destino cellulare. La comunicazione può essere diretta (ad esempio, giunzione gap, molecole di adesione) o interazioni indirette (ad esempio, secretoma). Il "secretoma" comprende tutti i fattori solubili (es. citochine, chemochine, fattori di crescita, peptidi neuronali, ormoni) e insolubili (es. vescicole extracellulari, esosomi) rilasciati dalle cellule. Sebbene tutte le modalità di comunicazione siano vitali per il corretto funzionamento, il secretoma, e in particolare le sue microvescicole, sta emergendo come un attore critico nella regolazione ematopoietica (9, 22-24). Le microvescicole sono particelle delimitate da doppio strato lipidico rilasciate dalle cellule che fungono da mezzo di comunicazione intercellulare indiretta fondendo e incorporandosi con le cellule vicine (25). È importante sottolineare che le vescicole extracellulari si trovano in tutti i fluidi biologici e possono anche essere raccolte dalle cellule in vitro (25). In questa sezione vengono discussi gli esosomi, una sottoclassificazione specifica delle vescicole extracellulari.

Caratterizzazione

Esistono varie classi di vescicole extracellulari, comprese le microvescicole, i corpi apoptotici e gli esosomi. Ciascuna sottocategoria si distingue in base alle dimensioni e ai marcatori legati alla membrana. Gli esosomi hanno un diametro compreso tra 30 e 150 nm ed esprimono diversi marcatori di membrana. Più recentemente, gli esosomi sono stati suddivisi in due sottopopolazioni: piccoli esosomi (Exo-S) con diametri da 60 a 80 nm ed esosomi grandi (Exo-L) con diametri da 90 a 120 nm (27).

Biogenesi

Rispetto ad altre sottoclassi di vescicole extracellulari, gli esosomi hanno origine nell'endosoma. I primi endosomi si formano attraverso il germogliamento interno (invaginazione verso l'interno della cellula) della membrana plasmatica e maturano in endosomi tardivi e corpi multivescicolari (MVB) (28). I corpi multivescicolari sono endosomi che contengono porzioni interiorizzate della membrana limitante, formando “vescicole intraluminali” (ILV) (29). I corpi multivescicolari vengono quindi trasportati alla membrana plasmatica (verso quindi la superficie della cellula) dove si fondono con la membrana cellulare e rilasciano le loro vescicole intraluminali nello spazio extracellulare come esosomi (28).

La biogenesi degli esosomi è principalmente controllata dal complesso di diverse proteine e molecole lipidiche che servono per lo smistamento endosomiale richiesto per il trasporto e le fusioni di membrana (30-43).

Carico

Gli esosomi sono stati originariamente proposti come contenitori di rifiuti cellulari (44). Tuttavia, gli studi contemporanei hanno scoperto l'importante ruolo degli esosomi come corrieri intercellulari

cruciali che consegnano messaggi attraverso contenuti molecolari distinti. È stato dimostrato che il contenuto di esosomi varia a seconda della cellula da cui vengono rilasciati, indicando che il loro carico è direttamente correlato alla cellula di origine (45-47). Gli esosomi contengono un'ampia varietà di proteine, lipidi, metaboliti e acidi nucleici, inclusi RNA messaggero (mRNA), microRNA (miRNA), RNA non codificanti (ncRNA), RNA circolare (cRNA) e DNA (48, 49). I contenuti esosomiali cambiano a seconda delle condizioni di crescita, dei trattamenti e dei fattori esterni (50).

Aggancio e rilascio

I corpi multivescicolari vengono trasportati dal citoplasma per l'aggancio alla membrana plasmatica attraverso interazioni con la rete citoscheletrica di actina e microtubuli (57, 58). Al loro arrivo, i corpi multivescicolari devono fondersi con la membrana plasmatica per rilasciare esosomi nell'ambiente extracellulare. Molti tipi diversi di proteine sono coinvolte in questo processo di fusione (59-66).

Assorbimento ed effetti a valle

Gli esosomi vengono rapidamente assorbiti dalle cellule bersaglio (71). Endocitosi è un termine ampio che si applica a una serie di molteplici vie attraverso le quali gli esosomi possono essere interiorizzati (72-75, 36). Oltre alle interazioni proteina-recettore, gli esosomi sono in grado di fondersi direttamente con la membrana plasmatica delle cellule bersaglio per fornire il loro carico poiché gli esosomi esibiscono anche membrane a doppio strato lipidico (76, 77).

Una volta incorporati nella cellula bersaglio, gli esosomi regolano specifici percorsi a valle attraverso il loro carico molecolare, dando loro la capacità di modulare microambienti locali e distanti attraverso segnali paracrini e autocrini (78). Il ruolo degli esosomi nel BMM sano è illustrato in Fig. 1. Nel contesto del cancro, tuttavia, gli esosomi svolgono un ruolo importante nella progressione del tumore e nella metastasi. Gli esosomi sono stati implicati nella formazione di nicchie premetastatiche e nel supporto della progressione del tumore attraverso la promozione dell'angiogenesi, la modulazione del sistema immunitario e il rimodellamento del tessuto parenchimale (79). Le cellule tumorali secernono esosomi che possono attivare recettori o modificare l'espressione di miRNA o RNA generale in cellule sane vicine che alterano i loro fenotipi biologici (80). Inoltre, è stato dimostrato che gli esosomi provenienti dalle cellule tumorali alterano la risposta immunitaria inattivando la proliferazione dei linfociti e delle cellule natural killer, innescando anche la risposta immunitaria per creare un microambiente infiammatorio (81). Durante la metastasi, le cellule tumorali rilasciano esosomi che hanno portato le cellule a subire la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) (82). Nelle sezioni seguenti, la comunicazione bidirezionale mediata dall'esosoma sarà discussa nel contesto di specifiche cellule del microambiente del midollo osseo, cellule maligne, neoplasie ematologiche e tumore al seno.

Tumori associati al midollo osseo

Nel mondo, a un uomo su tre e a una donna su cinque dovrebbe essere diagnosticato un cancro nel corso della loro vita (83). Il midollo osseo è un organo associato a diverse neoplasie maligne a causa della sua abbondanza di cellule e fattori di segnalazione. Non sorprende che i tumori del sistema ematopoietico, indicati come neoplasie ematologiche, abbiano origine nel midollo osseo. Inoltre, è stato riportato che le cellule tumorali di altri tumori solidi in altre parti del corpo

metastatizzano al midollo osseo, comprese le cellule del cancro al seno, allo stomaco, alla prostata, al colon e ai polmoni (84). Al fine di restringere l'ambito di questo capitolo, ci concentreremo specificamente su cancro al seno.

Tumori associati al midollo osseo colpiscono ogni anno sostanziali popolazioni di americani.

Tumori ematologici come le leucemie (leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia linfoblastica acuta (LLA), leucemia linfoblastica cronica (LLC)), linfomi e malattie mielodisplastiche (mieloma multiplo (MM)), sono stati oggetto di 176.000 nuove diagnosi e 56.000 decessi americani nel solo 2019 (85). Inoltre, per il cancro al seno, si stima che nel 2019 negli Stati Uniti saranno diagnosticati oltre 315.000 casi, che rappresentano il 15,2% di tutti i nuovi casi di cancro e provocano circa 41.000 decessi (86). Di questi, un enorme 81% dovrebbe essere costituito da diagnosi di cancro al seno invasive/metastatiche, che colpiscono rispettivamente circa 268.600 e 2.670 donne e uomini (86). In particolare, la presenza di cellule del cancro al seno nel midollo osseo è associata a prognosi sfavorevole (87-89).

In sintesi, come risultato della loro associazione con il midollo osseo e della loro prevalenza in clinica, il resto di questo capitolo si concentrerà sulle neoplasie ematologiche e sul carcinoma mammario metastatico del midollo osseo (BC).

Microambiente nel mantenimento delle cellule staminali del cancro

Il microambiente tumorale è stato descritto come un “sistema adattivo complesso” per le sue caratteristiche uniche e dinamiche (9, 90). Inoltre, ci sono prove crescenti che suggeriscono una relazione intricata tra le cellule tumorali e le cellule native del microambiente del midollo osseo (BMM). In particolare, le cellule tumorali sono in grado di appropriarsi dei meccanismi consolidati utilizzati per il midollo osseo per supportare le cellule staminali ematopoietiche sane per promuovere la propria sopravvivenza. Ad esempio, è stato dimostrato che le cellule leucemiche dirottano il secretoma del BMM per indurre la progressione e la resistenza alla terapia (22, 23, 91). Inoltre, i modelli sperimentali hanno stabilito una varietà di alterazioni nel microambiente del midollo osseo perturbano l'emopoiesi normale e promuovono la trasformazione maligna (92-97). Inoltre, nel cancro al seno metastatico al midollo osseo, è stato segnalato che anche le cellule del cancro al seno disseminate (BCC) dirottano il microambiente del midollo osseo, che può indurre in queste cellule un fenotipo dormiente, caratterizzato da quiescenza del ciclo cellulare e chemioresistenza (98-101). Adottando questo fenotipo dormiente, le cellule metastatiche del cancro al seno possono eludere il sistema immunitario e persistere nel midollo per decenni. Dopo l'eventuale attivazione, possono metastatizzare in siti terziari e portare alla recrudescenza del cancro.

Inoltre, le cellule del cancro al seno disseminate dormienti, come le cellule staminali della leucemia, mostrano proprietà delle cellule staminali del cancro (CSC); agiscono come cellule tumorali che esibiscono capacità di auto-rinnovamento, resistono ai trattamenti convenzionali ed esprimono tipici marcatori di cellule staminali (102). Nel compartimento ematopoietico, le cellule staminali del cancro sfruttano le risorse utilizzate dalle cellule staminali ematopoietiche. Ciò rappresenta una sfida per il trattamento delle cellule staminali del cancro nel midollo osseo.

Comunicazione mediata dall'esosoma: neoplasie ematologiche

Cellule endoteliali (EC)

Le EC promuovono il normale mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche in vitro e in vivo (103–107). Si pensa che ciò avvenga sia indirettamente attraverso fattori solubili sia direttamente attraverso i recettori (108-110). Più recentemente, in particolare, è stato anche dimostrato che gli esosomi derivati da cellule endoteliali (EC) svolgono un ruolo importante nella progressione del cancro ematologico. In termini di angiogenesi, gli esosomi di linee cellulari leucemiche inducono attività angiogenica nelle cellule endoteliali ombelicali umane (HUVEC) tramite il trasferimento di microRNA.

L'importanza delle interazioni esosomiali con le EC non si limita all'angiogenesi, ma anche ad altri processi associati al cancro (117).

Cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le normali cellule staminali ematopoietiche perivascolari sono supportate da una varietà di cellule mesenchimali, come le MSC che sono adiacenti e co-localizzate con le HSC di cui ne regolano il funzionamento (quiescenza o proliferazione).

Oltre al loro ruolo nella normale ematopoiesi, diversi studi coinvolgono le MSC e i loro esosomi nelle neoplasie ematologiche. È stato dimostrato che gli esosomi derivati da cellule leucemiche trasportano diverse molecole di RNA rilevanti per la patogenesi della leucemia (122-125).

Le MSC sono ben note per la loro capacità di modulare la risposta immunitaria, una caratteristica che viene sfruttata dalle cellule maligne per promuovere la propria sopravvivenza. Gli esosomi derivati dalla leucemia linfoide cronica (LLC) trasferiscono micro RNA e proteine nelle MSC che inducono un fenotipo infiammatorio e trasformano le MSC in fibroblasti cancerogeni (117). Sono stati anche mostrati esosomi derivati da MSC per inibire la proliferazione dei linfociti attivati (126). Diversi studi dimostrano che gli esosomi delle MSC promuovono la tolleranza immunitaria e la progressione del cancro attraverso il loro carico e le proteine di superficie (127-134).

Macrofagi

Il ruolo dei macrofagi nel mantenimento delle cellule ematopoietiche normali e maligne continua ad essere studiato. Precedenti studi hanno dimostrato che i macrofagi inibiscono la funzione degli osteoblasti e provocano una robusta mobilitazione delle cellule staminali ematopoietiche e loro precursori (135). Inoltre, i macrofagi trattati con esosomi derivati da cellule ematopoietiche hanno mostrato livelli ridotti di ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno e livelli aumentati di fattori di crescita, suggerendo che questi esosomi possono alterare il microambiente locale del midollo osseo per rinforzare la leucemia (136).

Osteoblasti

Gli osteoblasti (cellule che partecipano alla formazione di tessuto osseo) all'interno della nicchia endossea del midollo osseo possono anche supportare l'emopoiesi (137-139). È interessante notare che il numero di cellule staminali ematopoietiche è aumentato nelle aree in cui si forma nuovo osso trabecolare e, come tale, la sua superficie è arricchita di osteoblasti (140). Sebbene questi studi siano stati eseguiti nel contesto dell'emopoiesi normale, le informazioni possono essere estrapolate per comprendere come gli osteoblasti contribuiscano al supporto mediato dalla nicchia del midollo osseo dell'emopoiesi disregolata e della malignità ematologica. La malignità ematologica può influenzare il microambiente del midollo osseo, compresi gli esosomi derivati dal cancro come

mediatori. Ad esempio, cellule del mieloma multiplo possono sopravvivere all'interno delle lesioni ossee, a causa dello squilibrio del rapporto osteoblasti-osteoclasti. È stato dimostrato che questo squilibrio è causato da esosomi derivati alle cellule tumorali, con conseguente aumento della produzione di interleuchina 6 nelle cellule mesenchimali. L'IL-6 ha quindi soppresso la differenziazione osteoblastica, con conseguente aumento degli osteoclasti (cellule che partecipano alla distruzione del tessuto osseo) (141-142). Inoltre, gli esosomi derivati da cellule leucemiche hanno sottoregolato i normali geni correlati all'osteogenesi e sovra-regolano i geni associati alla sopravvivenza e alla crescita tumorale (23).

Comunicazione mediata dall'esosoma: cancro al seno metastatico al midollo osseo

Cellule endoteliali

Il microambiente del cancro al seno primario è altamente vascolarizzato e facilita la metastasi agli organi secondari, come il midollo osseo. Le cellule del cancro al seno non metastatici inducono permeabilità vascolare attraverso la secrezione di micro RNA che prende di mira la proteina delle giunzioni strette tra le cellule, facilitando la metastasi agli organi secondari, come il midollo osseo (143). Al contrario, l'inibizione di queste molecole di micro RNA nelle cellule del cancro al seno altamente metastatici mitiga la permeabilità vascolare e le metastasi (143). Analogamente al tumore primitivo, dopo la metastasi al midollo osseo, la vascolarizzazione qui aumenta (144). Gli esosomi delle cellule cancerogene attivano la segnalazione del fattore di crescita endotelio vascolare (VEGF) nelle cellule endoteliali promuovendo l'angiogenesi all'interno della nicchia tumorale. L'inibizione del rilascio di esosomi inibisce la produzione VEGF (145). Gli esosomi delle cellule staminali mesenchimali possono sopprimere la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali attraverso la sottoregolazione dell'espressione di VEGF nelle cellule del cancro al seno (146).

Cellule staminali mesenchimali

È stato studiato il ruolo degli esosomi derivati da cellule staminali mesenchimali (MSC) nelle metastasi, nell'invasione e nella formazione di nicchie premetastatiche. Linee cellulari di cancro al seno a bassa invasività/metastasi mostrano una maggiore capacità migratoria dopo il trattamento con esosomi derivati da MSC (147, 148, 149).

Simile alle neoplasie ematologiche, le MSC sono implicate nella regolazione del fenotipo immunitario, della differenziazione, della quiescenza ciclica e della chemioresistenza delle cellule del cancro al seno.

Macrofagi

A seconda dei segnali microambientali, i macrofagi possono promuovere o sopprimere lo sviluppo delle cellule del cancro al seno nella nicchia del midollo osseo. Uno studio recente ha indicato che gli esosomi derivati da cellule del cancro al seno educano i macrofagi a rilasciare citochine pro-infiammatorie che potenzialmente reclutano altre cellule immunitarie e, in definitiva, migliorano le metastasi (153, 154).

Poiché il dialogo tra macrofagi e cellule del cancro al seno è bidirezionale, gli esosomi rilasciati dai macrofagi possono riprogrammare le cellule tumorali per facilitare la sopravvivenza o ridurre il carico tumorale. Ad esempio, cellule del cancro al seno apoptotiche migliorano il rilascio di esosomi dai macrofagi che favoriscono il progresso del tumore (155). Gli esosomi derivati da

macrofagi di tipo M1 hanno proprietà antitumorali e possono fungere da vettore di agenti terapeutici, come il paclitaxel, per ridurre la crescita del tumore (156). Nostri studi precedenti hanno dimostrato che i macrofagi di tipo M2 possono formare giunzionale gap (GJIC) con le cellule staminali del cancro al seno nel midollo osseo e questo era importante per mantenere la dormienza (47). Un effetto opposto è stato osservato con i macrofagi M1, che hanno promosso metastasi di cellule del cancro al seno in organi distanti tramite esosomi (47).

Osteoblasti

Cellule del cancro al seno migrano dalla nicchia perivascolare del midollo osseo verso l'endostio. Gli osteoblasti sono cellule che depongono l'osso e sono fondamentali per il mantenimento della struttura ossea. Uno squilibrio tra la rimozione dell'osso e la deposizione può essere vantaggioso per le cellule tumorali che si stabiliscono all'interno della nicchia. Tale compromissione è stata segnalata in roditori e nell'uomo con cancro al seno metastatico in cui le lesioni sono spesso presentate come un segno distintivo di metastasi ossee. Nella nicchia endostale, gli osteoblasti possono essere educati dalle cellule tumorali per portare alla dormienza cellulare e della staminalità in queste ultime (157). Inoltre, le cellule del tumore al seno possono rilasciare micro RNA per ridurre la secrezione di collagene e sopprimere il rimodellamento osseo (159). Gli esosomi derivati da queste cellule contribuiscono alla differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti per indurre lesioni ossee e facilitare la metastasi nella nicchia (160). Inoltre, gli osteoblasti trattati con esosomi derivati da cellule di cancro al seno hanno indotto l'espressione di fattori pro-osteoclasti e il rilascio di citochine coinvolti nella regolazione della produzione di osteoclasti (161).

Strategie terapeutiche

Terapie attuali

Il trattamento del cancro consiste principalmente in chemioterapia e/o radioterapia che mirano alle cellule tumorali in rapida divisione e alle cellule sane in rapida divisione. Come risultato di questa mancanza di specificità, molti pazienti sperimentano effetti indesiderati come caduta dei capelli, sintomi gastrointestinali e mielosoppressione. Inoltre, questi trattamenti inducono inavvertitamente la selezione di cloni resistenti al trattamento che sono implicati nella recrudescenza del cancro e un aumento associato dei tassi di mortalità. Allo stato attuale, la chemioterapia continua ad essere il trattamento di prima linea per i tumori liquidi e solidi, nonostante le scarse prognosi dei pazienti. Il trattamento delle neoplasie ematologiche può combinare la chemioterapia con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT), la radioterapia o terapie mirate a base molecolare di nuova concezione. L'HSCT è considerato un'opzione terapeutica adiuvante per i pazienti resistenti alla chemioterapia e talvolta come terapia post-remissione (162, 163). L'HSCT prevede il trasferimento di HSC dal paziente (autologo) o da un donatore (allogeneico) nel paziente dopo l'ablazione del sistema ematopoietico disfunzionale del paziente. Sebbene questa procedura abbia subito enormi miglioramenti negli ultimi decenni, i principali svantaggi di queste terapie continuano a includere la malattia del trapianto contro l'ospite, la tossicità dei farmaci e il rischio di recidiva dovuto alla presenza di cellule tumorali residue (164, 165). Complessivamente, l'HSCT ha un beneficio terapeutico più elevato rispetto alle strategie chemioterapiche e radioterapiche standard, ma il suo uso è limitato a causa di potenziali complicanze.

Per ridurre al minimo i limiti delle terapie convenzionali, sono stati avviati molti studi clinici della Food and Drug Administration (FDA) statunitense per nuove terapie mirate (più comunemente anticorpi monoclonali o agenti molecolari) che interferiscono specificamente con i meccanismi molecolari che contribuiscono alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule tumorali (166–168). Questi approcci mirati mirano a risparmiare le cellule sane, riducendo gli effetti collaterali negativi sperimentati dai pazienti. Sorprendentemente, i recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento ad alto rendimento hanno fornito importanti informazioni sull'inizio, la progressione e l'eterogeneità del cancro. Ad esempio, le indagini sulle varianti genetiche nei tumori liquidi hanno rivelato oltre 120 geni che agiscono come "driver" per la sopravvivenza delle cellule tumorali (22). Tali alterazioni genetiche possono essere utilizzate nella medicina di precisione per migliorare la diagnosi di neoplasie ematologiche e identificare terapie mirate per affrontare la malattia (169, 170). Recentemente, la FDA ha approvato diverse terapie mirate per il trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA) (171-177). Gli svantaggi di queste strategie approvate includono l'incapacità di affrontare efficacemente l'eterogeneità genetica e la resistenza sviluppate dalle cellule maligne attraverso l'alterazione della struttura della molecola bersaglio o il percorso meccanicistico coinvolto nella progressione del cancro (178, 179).

Terapie a base di esosomi

Come discusso nelle sezioni precedenti, prove crescenti suggeriscono che il microambiente del midollo osseo è coinvolto nello sviluppo del cancro attraverso mediatori intercellulari, come gli esosomi (180, 181). Pertanto, si teorizza che i trattamenti attuali mancano di efficacia clinica a causa del ruolo del microambiente (9, 10, 91, 182). Pertanto, le strategie terapeutiche mirate alla produzione, secrezione e assorbimento di esosomi possono essere una strada praticabile per migliorare l'efficacia terapeutica nei pazienti con tumori ematologici o metastatici. Per rispondere a questa esigenza, numerosi studi preclinici e clinici in corso mirano a identificare percorsi associati all'esosoma mirati coinvolti nella progressione del cancro e nella resistenza ai farmaci (183-185). Allo stesso modo, i ricercatori hanno anche tentato di sviluppare tecnologie per rimuovere gli esosomi patogeni (186-189).

Il targeting di specifici carichi di esosomi è stato anche studiato per usi terapeutici (190-191). Inoltre, gli esosomi sono attraenti come veicoli per la consegna di farmaci grazie alle loro dimensioni su nanoscala e alla capacità di consegnare il loro carico alle cellule bersaglio (192). Un sistema di somministrazione del farmaco ideale consente la somministrazione controllata e sito-specifica dell'agente terapeutico, evita il riconoscimento e previene la degradazione prematura da parte del sistema immunitario. Gli esosomi hanno meno probabilità di essere considerati immunogenici o citotossici rispetto ai sistemi di rilascio sintetici a causa della loro origine endogena. Inoltre, gli esosomi possono proteggere gli agenti incapsulati dalla rapida eliminazione nel sangue, riducendo la citotossicità sistemica. Ciò è rafforzato dal fatto che gli esosomi mostrano uno scarso accumulo a lungo termine in qualsiasi organo o tessuto specifico (193). Il trattamento con esosomi caricati con paclitaxel ha portato a una diminuzione della proliferazione delle cellule tumorali del pancreas rispetto agli esosomi di controllo, indicando il successo del confezionamento e della somministrazione del farmaco attivo tramite esosomi (194). Inoltre, un altro gruppo ha caricato esosomi con catalasi, un potente antiossidante, per il trattamento del morbo di Parkinson (195).

Limitazioni delle terapie a base di esosomi

La somministrazione di farmaci e le strategie terapeutiche basate sull'esosoma sembrano promettenti, ma ci sono diversi problemi che devono essere affrontati prima di un'implementazione sicura ed efficace nell'ambiente clinico. In primo luogo, garantire la purezza e l'abbondanza degli esosomi è fondamentale per lo sviluppo di terapie a base di esosomi. Pertanto, i processi di isolamento e purificazione dell'esosoma devono essere ottimizzati e successivamente standardizzati al fine di eliminare i contaminanti e migliorare la riproducibilità. Allo stesso modo, le cellule donatrici che forniscono una fonte stabile di esosomi devono essere identificate e i loro esosomi completamente caratterizzati. Le condizioni di coltura per queste cellule devono essere ottimizzate e standardizzate per mitigare eventuali effetti sulla produzione di esosomi e sul carico incapsulato. Inoltre, devono essere sviluppati processi più efficienti per caricare i farmaci negli esosomi per massimizzare l'efficienza della produzione e della somministrazione di agenti terapeutici. Questi processi devono anche essere standardizzati per ridurre l'interruzione involontaria dell'integrità dell'esosoma.

Microambiente del midollo osseo in 3D: approcci in vitro per migliorare l'efficacia clinica

Gli studi riportano che i tassi di approvazione della FDA per i farmaci si aggirano continuamente intorno al 10% (196, 197). Di tutti i farmaci, i farmaci antitumorali hanno il tasso di successo complessivo più basso, con solo il 5,1% dei farmaci che entrano negli studi di Fase 1 ottenendo infine l'approvazione della FDA (197). Il 54% dei farmaci sperimentali fallisce nella fase avanzata dello sviluppo clinico (durante o dopo la Fase 3) (198). Di questi farmaci falliti, il 57% ha fallito a causa di "efficacia inadeguata", indicando che gli approcci di ricerca e sviluppo devono evolversi per migliorare l'efficacia clinica (198). Un approccio per ridurre il tasso di fallimento degli studi clinici sui farmaci è l'incorporazione di sistemi di colture cellulari tridimensionali (3D) in vitro nella ricerca biomedica preclinica. È ben noto che sottoporre le cellule a un paesaggio 3D che imita la natura del tessuto nativo desiderato suscita risposte cellulari più simili a quelle delle cellule in vivo rispetto alla coltura bidimensionale (2D) (199, 200). In quanto tale, la coltura 3D fornisce una fase più fisiologicamente rilevante in cui i potenziali farmaci possono essere controllati preclinicamente, collegando i test nei sistemi 2D e nei modelli animali, riducendo di conseguenza i fallimenti nella clinica. Pertanto, i modelli 3D sono vitali per lo sviluppo efficiente di farmaci e per migliorare la comprensione del tessuto sia nella salute che nella malattia.

Storicamente, il midollo osseo ha dimostrato di essere un organo complicato da studiare in vitro a causa della sua struttura flessibile e del complesso paesaggio cellulare. Sebbene impegnativi, diversi gruppi hanno tentato di ricapitolare la nicchia delle cellule staminali ematopoietiche nei modelli 3D in vitro. Un lavoro recente ha dimostrato un aumento del mantenimento delle cellule ematopoietiche umane e di topo immature quando coltivate in strutture a 3D composti da strutture organiche e inorganiche (201-206). In termini di applicabilità alla fisiopatologia del cancro e agli esosomi, impalcature 3D di seta sono state utilizzate per studiare l'influenza degli esosomi da cellule staminali mesenchimali del midollo osseo normali e esposti a cellule del mieloma multiplo (124). Il modello 3D tissutale del midollo osseo sviluppato da de la Puente e colleghi ha consentito di evidenziare interazioni fisiologicamente rilevanti tra cellule del microambiente del midollo osseo e cellule del mieloma multiplo, inclusi gradienti solubili e resistenza ai farmaci indotta, nonché proliferazione delle cellule di mieloma (207). Il gruppo prevede di utilizzare questo modello per lo

sviluppo di terapie personalizzate per i pazienti con mieloma multiplo, e questo modello è anche maturo per l'uso per lo studio degli esosomi nel microambiente del midollo osseo normale e maligno, consentendo l'identificazione di specifici bersagli esosomiali.

Conclusione

Il microambiente del midollo osseo svolge un ruolo innegabile nel mantenimento della normale emopoiesi. Tuttavia, questo meccanismo attraverso il quale le cellule staminali ematopoietiche dipendono dal midollo osseo viene sfruttato dalle cellule maligne. Attraverso lo scambio di esosomi tra altri fattori, le cellule di neoplasie ematologiche e del cancro al seno metastatico traggono supporto da tipi cellulari distinti nel microambiente del midollo osseo e, in definitiva, promuovono la propria sopravvivenza. Gli studi attuali e futuri acquisiranno una migliore comprensione delle interazioni esosomiali nel microambiente tumorale. Ciò consentirà agli scienziati di sviluppare terapie più efficaci che tengano conto del ruolo del microambiente. Le terapie a base di esosomi sono approcci promettenti per indirizzare la comunicazione intercellulare che può fungere anche da adiuvante alle attuali terapie approvate. Il metodo con cui fornire il trattamento esosomico rimane una sfida. Integrando la modellazione 3D in vitro nell'identificazione del target e nel paradigma di sviluppo della terapia esosomica, possiamo garantire tassi più elevati di traslazione efficace in contesti preclinici e clinici.