

Titolo: Tunnelling di nanotubi e microtubi tumorali nel cancro - Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer

Codice: MUT011

Autore: Roehlecke e Schmidt

Data: 2020

Rivista: Cancers, 12(4), 857

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12040857>

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7226329/>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2022/04/08/mut011-roehlecke-e-schmidt-2020/>

Parole chiave: tunnel di nanotubi (TNT), microtubi tumorali (TM), biologia delle cellule tumorali, comunicazione intercellulare, trasferimento intercellulare, microambiente tumorale

Tumore: n/a

Traduzione: tradotto in modo pressoché fedele con solo minimi tagli e semplificazioni

### **Punti di interesse**

La comunicazione intercellulare può avvenire attraverso diversi meccanismi indiretti come la secrezione di citochine e chemochine, microvescicole o esosomi. Può verificarsi direttamente tramite contatti cellulari come giunzioni gap o sinapsi. Queste forme di comunicazione intercellulare sono più efficaci su brevi distanze. Su lunghe distanze, sono necessari recettori rilevanti in grado di riconoscere e legare fattori diffusibili per effettuare la comunicazione tra le cellule. I tunnel di nanotubi (TNT) o microtubi sono un altro tipo di comunicazione cellulare, in quanto consentono alle cellule di comunicare direttamente tra loro su distanze maggiori. I TNT/TM sono stati trovati in diversi organismi e tessuti in diversi tipi cellulari. TNT e TM sono presenti anche nelle cellule tumorali. Diversi studi hanno riportato TNT in linee cellulari di carcinoma della vescica, carcinoma uroteliale, cancro al seno, carcinoma della cervice, cancro del colon, glioblastoma, leucemia, mesotelioma, osteosarcoma, cancro ovarico, adenocarcinoma, feocromocitoma, cancro alla prostata e carcinoma a cellule squamose. Inoltre, i TNT sono stati rilevati anche in diversi tipi di tumore espianato da pazienti tra cui mesotelioma, cancro ovarico, osteosarcoma, cancro del pancreas, carcinoma a cellule squamose e carcinomi laringei.

Le cellule tumorali possono utilizzare i TNT/TM per comunicare sia tra le cellule maligne (interazioni omotipiche) che tra le cellule del microambiente tumorale (interazioni eterotipiche). Le cellule del microambiente tumorale collegate con tubi di membrana sono cellule stromali come cellule endoteliali, periciti (un tipo di cellula mesenchimale staminale che si trova attorno a vasi e capillari), cellule staminali mesenchimali, neuroni, fibroblasti, osteoblasti, macrofagi.

Prove crescenti suggeriscono che la comunicazione intercellulare da parte di TNT e TM può contribuire alla sopravvivenza e alla progressione del tumore. Questi tubi a membrana possono collegare le cellule a distanze considerevoli. In un tumore solido, le cellule tumorali possono diffondersi, in modo che la comunicazione diretta tramite giunzioni, microvescicole o esosomi sia impossibile. In questi casi, TNT e TM funzionano da guide di comunicazione spaziale, consentendo il contatto fisico diretto a distanza tra le membrane cellulari che inviano e ricevono il segnale. Superano la sfida del trasporto del segnale attraverso strutture tortuose all'interno del microambiente tumorale.

Si è scoperto che i TNT agiscono come un sistema di trasporto cellulare tra le cellule. Finora, le funzioni proposte dei TNT sono lo scambio a lunga distanza di diversi componenti cellulari, che vanno da proteine, materiali genetici inclusi microRNA e siRNA, fino ad altri carichi citoplasmatici come mitocondri, vescicole del Golgi e persino virus. La continuità nella membrana plasmatica e nel citoplasma delle cellule collegate consente il trasporto intercellulare ed è mediata dalle fibre del citoscheletro. I TNT sono strutture transitorie con una durata da minuti a diverse ore. Si formano o da una protusione di membrana che si accresce, o quando due cellule accoppiate si staccano da uno stretto contatto. I TM contengono microvescicole e mitocondri, suggerendo che esiste un traffico di vescicole e anche una produzione locale di ATP nei tubi della membrana. È stato dimostrato che le TM mediano principalmente il trasporto di calcio e piccole molecole tra le cellule. Le connessioni TM sono composte da giunzioni gap.

## **Funzioni di TNT e TM nel cancro**

### **Crescita e invasione del cancro: interazioni omotipiche tra cellule tumorali**

TNT e TM sono stati associati alla crescita e all'invasione delle cellule tumorali. La migrazione cellulare nelle fasi di sviluppo richiede la crescita guidata di protrusioni cellulari in estensione. Il numero di TM aumenta con la progressione del tumore. Sono usati come binari guida per la diffusione.

### **Crescita e invasione del cancro: interazioni eterotipiche**

Prove crescenti suggeriscono che la comunicazione intercellulare tra le cellule del tumore e lo stroma circostante all'interno del microambiente tumorale è essenziale per il progresso dei tipi di cancro invasivo.

### **Sopravvivenza delle cellule tumorali**

Nel glioma dopo il danno fotonico causato dall'irradiazione laser letale, la cellula morta è stata avvicinata da nuove TM che si estendevano dalle cellule di glioma vive circostanti. Un nuovo nucleo cellulare è stato traslocato nella cellula ablata utilizzando TM in pochi giorni. **Il danno fotonico di più cellule ha portato a una rapida espansione dei TM delle cellule gliali nell'area danneggiata. Il fatto che le condizioni di stress promuovano la formazione del tubo della membrana indica che le TM rappresentano una sorta di meccanismo di sopravvivenza.** Coerentemente, l'ipossia presente in vari tipi di cancro può anche favorire la formazione di TNT. È stato anche osservato che le cellule stromali del midollo osseo traslocano i mitocondri nelle cellule leucemiche della leucemia linfoblastica acuta (ALL) durante lo stress ossidativo causato da terapie.

### **Modulazione delle cellule tumorali e dell'ambiente tramite carico mediato da TNT/TM**

#### **Trasferimento di mitocondri**

I mitocondri possono essere trasferiti tra le cellule dai TNT. Tale trasferimento di mitocondri attraverso i TNT è stato osservato tra le cellule microambientali tumorali e le cellule tumorali e tra le cellule tumorali in molti diversi tipi di cancro, tra cui mesotelioma, leucemia, carcinoma a cellule squamose, mammella, vescica, tumori ovarici così come nel glioblastoma. Gli effetti metabolici dei mitocondri acquisiti sono stati dimostrati in numerosi studi in vitro. Da notare che la traslocazione mitocondriale mediata da TNT ha modificato il metabolismo energetico della cellula ricevente. L'acquisizione dei mitocondri da parte delle cellule tumorali ha comportato un aumento del tasso di proliferazione e dell'invasività.

#### **Trasferimento di microRNA**

È stato riportato che i TNT facilitano il trasporto di microRNA oncogenici (miRNA) tra le cellule tumorali e tra il tumore e le cellule stromali circostanti. È stato dimostrato ad esempio tra cellule di osteosarcoma e osteoblasti stromali o tra cellule di cancro ovarico e cellule dell'epitelio ovarico. Inoltre, il trasferimento orizzontale di miRNA tra cellule tumorali metastatiche e cellule endoteliali da parte dei TNT è stato recentemente collegato all'invasività metastatica.

#### **Trasferimento di oncogeni**

Recentemente è stato dimostrato che il trasferimento di oncogeni tra le cellule può essere mediato da TNT di cellule tumorali del colon. Tale traslocazione intercellulare di oncogeni si traduce in una distribuzione

eterogenea di un genotipo mutante. Uno degli oncogeni più frequentemente mutati nel cancro, è noto per agire come una forza trainante fondamentale nei tumori come il cancro del colon-retto e del pancreas, modula profondamente l'ambiente tumorale, comprese le risposte del sistema immunitario verso il tumore, i fibroblasti associati al cancro e le risposte angiogenetiche. Quindi l'amplificazione della diffusione di alcuni oncogeni tramite la traslocazione mediata da TNT può avere importanti conseguenze per la progressione del tumore, il che implica che i **TNT hanno il potenziale per riprogrammare le cellule maligne e alterare le cellule nell'ambiente tumorale.**

### **Trasferimento di esosomi e altri carichi**

TNT ed esosomi possono lavorare in sinergia. Nelle cellule del mesotelioma umano è stato dimostrato che gli esosomi tumorali esogeni inducono una maggiore formazione di TNT come ulteriori metodi di trasporto intercellulare.

### **Angiogenesi**

L'angiogenesi è un segno distintivo dei tumori. L'interruttore angiogenico è un processo attraverso il quale le cellule tumorali sviluppano un fenotipo angiogenico, avviando così l'angiogenesi. Lo studio di Errede et al. implica un ruolo primario dei TNT nell'angiogenesi tumorale.

### **Resistenza al trattamento**

Per i tumori invasivi come il glioblastoma, l'attuale terapia standard consiste in una combinazione di chirurgia, radioterapia e chemioterapia, ma il successo terapeutico rimane scarso. Ciò è dovuto al fatto che TNT e TM contribuiscono alla resistenza al trattamento stabilendo reti tra le cellule tumorali. Tali reti possono estendersi al tessuto circostante il tumore, aumentando così il suo potenziale maligno.

### **Resistenza alle lesioni chirurgiche**

La rete di glioblastoma collegata a TM è stata in grado di ripararsi da sola quando è stata eseguita un'escissione chirurgica laser. È stato dimostrato che le cellule di glioblastoma formavano ed estendevano più TM verso l'area lesa. Una lesione chirurgica è in grado di innescare un ripopolamento eccessivo della lesione con cellule di glioblastoma mediate da TM. Coerentemente, la maggior parte dei tumori, dopo chirurgia riappaiono al margine di resezione.

### **Resistenza alla chemioterapia**

È stato osservato che gli agenti chemioterapici hanno il potenziale di influenzare la formazione di TNT e il traffico di "merci". È stato dimostrato che i TNT/TM mediano la chemioresistenza, ad esempio, nelle cellule del cancro ovarico e mammario, nelle cellule del cancro del pancreas, nelle cellule della leucemia e nelle cellule del glioblastoma. Anche i TM contribuiscono alla resistenza alla chemioterapia.

### **Resistenza alla radioterapia**

Le cellule di glioma collegate da TM hanno anche dimostrato di essere più robuste e mostrano tassi di sopravvivenza più elevati sotto radioterapia standard, presumibilmente perché la rete TM promuove un'omeostasi multicellulare più stabile.

### **Sfide tecniche relative ai TNT e TM**

Studiare la funzione dei TNT è impegnativo perché la loro natura fragile è difficile da preservare dopo la fissazione dei tessuti, rendendo inevitabili gli esperimenti in vitro. Inoltre, ad oggi mancano specifici marcatori molecolari o strutturali di TNT e TM. Pertanto la visualizzazione delle loro caratteristiche morfologiche e la valutazione delle loro caratteristiche funzionali, in particolare per quanto riguarda il trasporto intercellulare di carichi, rimangono gli unici strumenti per identificare TNT e TM. Questi tubi a membrana sottile sono difficili da visualizzare nei tumori, specialmente nei tumori prevalentemente stromali che hanno una prognosi peggiore rispetto ai tumori non stromali. TNT e TM possono essere studiati in campioni di tumore clinico, ma ciò richiede metodi di rilevamento e visualizzazione 3D sofisticati e affidabili per osservare queste strutture lunghe e sottili. Sembra possibile una certa sovrapposizione tra TNT e TM a causa di diversi metodi di indagine, sebbene dati recenti indichino che sia TM che TNT mostrano eterogeneità molecolare e funzionale. Resta anche da chiarire se possono essere sottoclassificati in base alle caratteristiche strutturali. Ulteriori studi

di questi tubi a membrana nel loro microambiente nativo sono essenziali per una comprensione completa. L'esame in vivo di queste delicate strutture rimane un ostacolo importante allo studio della funzione dei tubi di membrana nel cancro. A questo proposito, ci si aspetta che le tecniche avanzate di microscopia intravitale forniscano il massimo guadagno per migliorare la nostra conoscenza delle loro caratteristiche distintive.

## Considerazioni finali

TNT e TM si sono i nuovi mediatori della comunicazione intercellulare. I dati in vitro hanno rivelato il loro potenziale per l'insorgenza e la progressione dei tumori formando reti di comunicazione all'interno del microambiente tumorale che aumentano la malignità consentendo la distribuzione del potenziale metastatico. Sebbene le conoscenze sui TNT/TM siano aumentate negli ultimi anni, molti aspetti complessi e intriganti restano da chiarire. L'identificazione di marcatori molecolari per TNT/TM in vivo, l'esplorazione di come si connettono TNT/TM, come supportano la comunicazione intercellulare, come sono regolati temporalmente e spazialmente, sono aspetti essenziali da approfondire per comprendere la comunicazione intercellulare e l'interazione tra le cellule tumorali e il loro microambiente.

## Traduzione articolo

### Riassunto

**La comunicazione intercellulare tra le cellule tumorali e il loro microambiente è fondamentale per la progressione della malattia. I meccanismi attraverso i quali avviene la comunicazione tra cellule distanti in una matrice tumorale rimangono poco conosciuti. Negli ultimi due decenni, prove sperimentali di diversi gruppi hanno dimostrato l'esistenza di sottili tubi membranosi che interconnettono le cellule, chiamati nanotubi, microtubi tumorali, citonemi o ponti di membrana. Queste sporgenze di membrana altamente dinamiche sono condotti per la comunicazione diretta da cellula a cellula, in particolare per la segnalazione intercellulare e il trasporto di carico cellulare su lunghe distanze. I tunnel di nanotubi e i microtubi tumorali possono svolgere un ruolo importante nella patogenesi del cancro. Possono contribuire alla resistenza delle cellule tumorali contro trattamenti come la chirurgia, la radio e la chemioterapia. In questa recensione, presentiamo le attuali conoscenze sulla struttura e la funzione dei nanotubi tunneling e dei microtubi tumorali nel cancro e discutiamo il potenziale terapeutico dei tubi a membrana nel trattamento del cancro.**

### 1. Introduzione

La comunicazione intercellulare può avvenire attraverso diversi meccanismi indiretti come la secrezione di citochine e chemochine, microvescicole o esosomi. Ma può anche verificarsi direttamente tramite contatti cellulari come giunzioni gap o sinapsi [1,2,3,4,5,6,7,8]. Queste forme di comunicazione intercellulare sono più efficaci su brevi distanze. Su lunghe distanze, sono necessari recettori rilevanti in grado di riconoscere e legare fattori diffusibili per effettuare la comunicazione tra le cellule. I tunnel di nanotubi (TNT) sono un altro tipo di comunicazione cellulare, in quanto consentono alle cellule di comunicare direttamente tra loro su distanze maggiori. Inizialmente i TNT sono stati riportati nella linea cellulare di feocromocitoma di ratto PC12 [9]. I TNT sono canali citoplasmatici intercellulari a lungo raggio per la comunicazione diretta da cellula a cellula che sono indipendenti dai fattori solubili. Unicamente, queste strutture consentono il rapido scambio di carichi cellulari tra cellule collegate e non adiacenti, inclusi organelli, vescicole, molecole, ioni e agenti patogeni [10,11,12,13,14,15,16].

Sempre più spesso, questi tubi a membrana sottile stanno diventando rilevanti per la comunicazione intercellulare. Sono implicati in diverse funzioni come la comunicazione intercellulare durante lo sviluppo iniziale, la migrazione cellulare, l'omeostasi mediata dalle cellule staminali e la rigenerazione. Da notare, i TNT possono essere utilizzati anche da agenti infettivi o patogeni come vie di diffusione, come è stato osservato nei casi di neurodegenerazione avanzata o progressione del cancro e metastasi [10].

I TNT sono stati trovati in diversi organismi e tessuti in diversi tipi cellulari come macrofagi [14,17], cellule

neuronal [12], cellule progenitrici endoteliali [18], cellule mesenchimali stromali [16,19], cellule mesoteliali [20,21], cellule dendritiche e monociti [22,23], cellule dell'epitelio pigmentato [24], cellule T [25,26], cellule B [27], neutrofili [28], cardiomiociti [29], cellule epiteliali tubulari prossimali renali [30], cellule renali [31] e nella cresta neurale nell'embrione di pollo [32]. Estensioni cellulari simili chiamate citonemi sono state osservate anche in organismi non mammiferi come la *Drosophila*. Questi citonemi sono stati descritti per partecipare alla segnalazione delle cellule staminali [33,34,35].

L'esistenza di TNT in vivo è stata dimostrata per la prima volta da Chinnery et al. nel 2008, che hanno descritto la loro presenza in un modello murino chimerico, tra cellule stromali corneali MHC di classe II positive derivate da donatori e residenti [36,37]. Nei tumori, la prima evidenza della presenza di TNT è venuta dagli studi di Lou et al. [21]. Questa è stata la prima dimostrazione di TNT nelle cellule tumorali primarie umane e nei tumori solidi intatti (asportati da pazienti con mesotelioma pleurico maligno e adenocarcinoma polmonare). Più recentemente, Osswald et al. hanno osservato tubi di membrana derivati da cellule tumorali sottili in un modello animale di tumori cerebrali maligni in vivo. I tubi a membrana osservati, chiamati microtubi tumorali (TM), sono più lunghi e hanno diametri maggiori rispetto ai TNT osservati in vitro [38]. Recentemente, sono state applicate tecniche microscopiche avanzate per caratterizzare i tubi a membrana ex vivo e in vivo, ad esempio Rehberg et al. ha dimostrato la funzione dei nanotubi di membrana in vivo utilizzando nuove tecnologie di imaging intravitale confocale [39].

La comunicazione intercellulare gioca un ruolo importante nell'omeostasi dei tessuti ed è un fattore essenziale per lo sviluppo, l'organizzazione del tumore e la sua resistenza agli approcci terapeutici [40,41,42], poiché i tumori sono altamente eterogenei [43,44,45]. La comunicazione tra le cellule tumorali e il loro microambiente è un processo che coinvolge una varietà di cellule ospiti residenti e infiltranti e una vasta gamma di meccanismi. Le cellule stromali microambientali non cancerose sono un gruppo eterogeneo che include cellule staminali mesenchimali e loro derivati, macrofagi associati al cancro, fibroblasti e un'ampia varietà di cellule immunitarie e infiammatorie. Il microambiente tumorale contribuisce alla progressione del tumore e alla sopravvivenza delle cellule tumorali [46,47,48]. Il trattamento di diversi tumori solidi maligni e invasivi, ad esempio tumori del cervello, del pancreas, del colon e delle ovaie, è limitato da un'insufficiente conoscenza della comunicazione intercellulare nel microambiente tumorale [42,49].

Prove crescenti suggeriscono che la comunicazione intercellulare da parte di TNT e TM può contribuire alla sopravvivenza e alla progressione del tumore. Questi tubi a membrana possono collegare le cellule a distanze considerevoli. In un tumore solido, le cellule tumorali possono diffondersi, in modo che la comunicazione diretta tramite giunzioni, microvescicole o esosomi sia improbabile se non impossibile. In questi casi, TNT e TM possono fungere da guide di comunicazione spaziale, consentendo il contatto fisico diretto a distanza tra le membrane cellulari che inviano e ricevono il segnale. Superano la sfida del trasporto del segnale attraverso strutture tortuose all'interno del microambiente tumorale e possono fornire restrizione spaziale, oltre che specificità. In questo modo, TNT e TM supportano il mantenimento del microambiente tumorale ed è stato suggerito che svolgano un ruolo importante nei microambienti tumorali.

## 2. Struttura dei TNTs

I TNT sono stati inizialmente caratterizzati come F-actina contenenti sottili canali membranosi che collegano due o più cellule su distanze brevi o lunghe [50]. I farmaci di depolimerizzazione della F-actina inibiscono la formazione di TNT [24,51,52]. Oltre alla F-actina, in alcune linee cellulari vengono rilevati anche microtubuli o filamenti di citocheratina [15,53,54]. Strutturalmente, i TNT variano in larghezza da 50 a 1000 nm e in lunghezza da pochi a 100  $\mu\text{m}$  [21,55,56]. Non toccano il supporto [50]. I TNT possono mostrare continuità di membrana tra le cellule collegate da TNT a estremità aperta ad entrambe le estremità [50] o hanno giunzioni gap interposte (TNT a estremità chiusa) [11].

Si è scoperto che i TNT agiscono come un sistema di trasporto cellulare tra le cellule. Finora, le funzioni proposte dei TNT sono lo scambio a lunga distanza di diversi componenti cellulari, che vanno da proteine, materiali genetici inclusi microRNA e siRNA, fino ad altri carichi citoplasmatici come mitocondri, vescicole del Golgi e persino virus [11,18,19,21,24,29,52,53,57,58,59,60,61,62,63]. La continuità nella membrana plasmatica e nel citoplasma delle cellule collegate consente il trasporto intercellulare ed è mediata dalle fibre del citoscheletro [55]. L'imaging delle cellule vive ha rivelato che i TNT sono strutture transitorie con una

durata da minuti a diverse ore [9,51,64]. Finora sono stati segnalati due diversi meccanismi di formazione de novo di TNT. Nel primo meccanismo di formazione di TNT, i TNT sono stabiliti da un'escrescenza diretta di una sporgenza simile a un filopodio verso una cellula vicina [9]. Nel secondo meccanismo di formazione del TNT, i TNT si formano rimuovendo le cellule attaccate dopo un primo stretto contatto [13,25,53,54]. In entrambi i casi, il processo di formazione delle sporgenze della membrana tubolare si basa sull'actina (rivisto in [54,65]).

### 3. Struttura dei TM

In un modello di glioblastoma nei topi, Osswald et al. ha studiato lo sviluppo del tumore in un anno utilizzando la microscopia a scansione laser multifotonica in vivo [38]. Hanno rilevato la crescita di TM che si sono formate in linee cellulari di glioblastoma derivate da pazienti xenotrapiante nei topi. È interessante notare che queste TM erano di lunga durata (da giorni a settimane). I TM hanno un alto contenuto di F-actina, una caratteristica chiave nella maggior parte dei nanotubi di membrana [9]. Sono rivestiti da una membrana cellulare continua e contengono miosina IIa e microtubuli. Sono stati anche trovati positivi per altre molecole proteiche [38]. Frequentemente è stata osservata anche una ramificazione in cui i tubi a membrana sottile più dinamici si formano da quelli più stabili e più spessi. I TM contengono microvescicole e mitocondri, suggerendo che esiste un traffico di vescicole e anche una produzione locale di ATP nei tubi della membrana. È stato dimostrato che le TM mediano principalmente il trasporto di calcio e piccole molecole tra le cellule. Le connessioni TM sono composte da giunzioni gap connexin 43 (Cx43) [38]. È interessante notare che le giunzioni gap contenenti Cx43 sono state frequentemente osservate nelle TM che collegano due cellule di glioma, ma anche in TM di diverse cellule di glioma che si incrociano l'una con l'altra. Cx43 è anche abbondante negli astrociti non maligni ed è il sottotipo di connexina più frequente nel SNC, in particolare nelle cellule di glioblastoma [38]. Sono necessari ulteriori studi sui TM per indagare se i TM si formano anche in altre entità tumorali.

I TM condividono molte caratteristiche strutturali con i TNT, come l'actina filamentosa predominante (F-actina), i mitocondri, le microvescicole o le giunzioni gap contenenti Cx43 e la segnalazione di Ca<sup>2+</sup> [38,77]. Esistono differenze tra TNT e TM per quanto riguarda la loro larghezza (TM: 1–2 µm, TNT: < 1 µm), lunghezza massima (TM: > 500 µm, TNT: circa 100 µm) e durata (TM: da ore a giorni, alcuni > 100 d, TNT: minuti, fino a 60 min).

Pontes et al. aveva dimostrato che le cellule di glioblastoma sono collegate da una rete tubolare con caratteristiche tipiche dei TNT [78]. Presumono che ciò possa riflettere le differenze tra gli esperimenti in vitro e in vivo per studiare i TNT. Tali differenze sono risultate caratteristiche e indicavano una maggiore stabilità strutturale in vivo rispetto a quella in vitro, che potrebbe avere origine in intervalli di tempo molto più lunghi per la crescita e la connessione e quindi una maggiore funzionalità.

### 4. Sfide tecniche relative ai tubi a membrana

Studiare la funzione dei TNT è impegnativo perché la loro natura fragile è difficile da preservare dopo la fissazione dei tessuti, rendendo inevitabili gli esperimenti in vitro. Inoltre, ad oggi mancano specifici marcatori molecolari o strutturali di TNT e TM. Pertanto la visualizzazione delle loro caratteristiche morfologiche e la valutazione delle loro caratteristiche funzionali, in particolare per quanto riguarda il trasporto intercellulare di carichi, rimangono gli unici strumenti per identificare TNT e TM. Questi tubi a membrana sottile sono difficili da visualizzare nei tumori, specialmente nei tumori prevalentemente stromali che hanno una prognosi peggiore rispetto ai tumori non stromali [79,80,81]. TNT e TM possono essere studiati in campioni di tumore clinico, ma ciò richiede metodi di rilevamento e visualizzazione 3D sofisticati e affidabili per osservare queste strutture lunghe e sottili. Sembra possibile una certa sovrapposizione tra TNT e TM a causa di diversi metodi di indagine, sebbene dati recenti indichino che sia TM che TNT mostrano eterogeneità molecolare e funzionale [15,82]. Resta anche da chiarire se possono essere sottoclassificati in base alle caratteristiche strutturali. Ulteriori studi di questi tubi a membrana nel loro microambiente nativo sono essenziali per una comprensione completa. L'esame in vivo di queste delicate strutture rimane un ostacolo importante allo studio della funzione dei tubi di membrana nel cancro. A questo proposito, ci si aspetta che le tecniche avanzate di microscopia intravitale forniscano il massimo guadagno per migliorare la nostra conoscenza delle loro caratteristiche distintive.

## 5. Presenza di TNT/TM nelle cellule tumorali

TNT e TM sono presenti anche nelle cellule tumorali [50,54,56,58]. Diversi studi hanno riportato TNT in linee cellulari di carcinoma della vescica, carcinoma uroteliale, cancro al seno, carcinoma della cervice, cancro del colon, glioblastoma, leucemia, mesotelioma, osteosarcoma, cancro ovarico, adenocarcinoma, feocromocitoma, cancro alla prostata e carcinoma a cellule squamose (Tabella 1). Inoltre, i TNT sono stati rilevati anche in diversi tipi di tumore espantato da pazienti tra cui mesotelioma [21], cancro ovarico [57,58], osteosarcoma [83], cancro del pancreas [84], carcinoma a cellule squamose [85] e carcinomi laringei [86]. Negli ultimi anni, la comprensione dei tubi di membrana tra le cellule tumorali è stata notevolmente ampliata dai rapporti di TM, che sono stati seguiti nei gliomi umani impiantati nel cervello del topo per un massimo di un anno [38,75,82,87]. Le cellule tumorali possono utilizzare i TNT/TM per comunicare sia tra le cellule maligne (interazioni omotipiche) che tra le cellule del microambiente tumorale (interazioni eterotipiche). Le cellule del microambiente tumorale collegate al tubo di membrana sono cellule stromali come cellule endoteliali, periciti, cellule staminali mesenchimali, neuroni, fibroblasti, osteoblasti, macrofagi (Tabella 1). L'aspetto dei tubi della membrana intercellulare può variare e dipende dal tipo di tumore. È stato dimostrato che la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) stimola la formazione di TNT nel mesotelioma [21].

L'indagine su campioni di tumore umano resecato ha rivelato che circa il 63% degli astrocitomi maligni formava TM intercellulari. Al contrario, i TM sono stati osservati solo raramente nelle cellule di oligodendroglioma di campioni di tumore umano o in cellule di oligodendroglioma derivate da pazienti impiantate nei topi [38].

I tumori solidi come i gliomi mostrano un'ampia eterogeneità cellulare intratumorale e intertumoreale. Sottopopolazioni, anche molto piccole, assumono funzioni specializzate essenziali per la progressione del cancro [45,89]. La comunicazione intercellulare tra queste sottopopolazioni può contribuire all'eterogeneità nel tumore stesso e anche nel suo microambiente da parte di TNT e TM. È stato osservato che le cellule di glioma mostrano una pronunciata eterogeneità per quanto riguarda la formazione di TM. È interessante notare che solo una sottopopolazione di cellule di glioma ha formato TM e solo poche di queste cellule TM-positive si sono collegate ad altre cellule tumorali con TM [38].

## 6. Funzioni di TNT e TM nel cancro

### 6.1 Crescita e invasione del cancro: interazioni omotipiche tra cellule tumorali

TNT e TM sono stati associati alla crescita e all'invasione delle cellule tumorali. La migrazione cellulare nelle fasi di sviluppo richiede la crescita guidata di protrusioni cellulari in estensione [110, 111, 38,112]. Il numero di TM aumenta con la progressione del tumore. Sono usati come binari guida per la diffusione dei nuclei cellulari dopo la cariocinesi, indicando che i TM sono importanti per la diffusione delle cellule tumorali (Figura 2). L'imaging della formazione di TM nei gliomi in vivo ha rivelato una rete multicellulare di cellule di glioma collegate da TM [38]: le TM intercellulari possono formarsi in conseguenza della divisione cellulare per garantire un contatto persistente tra cellule figlie, ma anche tra cellule di glioma non correlate. Pertanto le singole cellule tumorali sono interconnesse da tubi di membrana per rappresentare un grande sincizio. In particolare, la formazione di tale sincizio è correlata alla prognosi della malignità del tumore al cervello [38]. Onde di calcio intercellulari costantemente estese e a lungo raggio, in gran parte limitate alle cellule di astrocitoma, sono state osservate in varie regioni tumorali [38]. Inoltre, è stato dimostrato che un sottogruppo di cellule di astrocitoma esplora la nicchia perivascolare che è associata al pool di cellule staminali del cancro e dove le cellule sono rimaste per mesi [113]. Lo spazio perivascolare è una delle due vie utilizzate principalmente dalle cellule di glioma per invadere il tessuto cerebrale, l'altra è l'area circostante degli assoni [114,115]. Circa il 20% dei TM di glioma segue gli assoni nel cervello suggerendo che la migrazione delle cellule di glioma derivata da TM può verificarsi lungo gli assoni neuronali come segnali guida per la disseminazione delle cellule tumorali nei gliomi.

È importante notare che la comunicazione mediata dalla giunzione del gap Cx43 stabilizza le TM [38]. Di conseguenza, è stato osservato che la carenza di Cx43 porta a una riduzione delle dimensioni del tumore [116,117,82,118].

I TNT sembrano essere le strutture principali per l'invasione delle cellule del mesotelioma. Lou et al. mostrano che i TNT si formano sul bordo invasivo nelle cellule del mesotelioma in vitro [21]. Come rivelato

dall'imaging videomicroscopico, i TNT si sono formati regolarmente durante la proliferazione e la migrazione delle cellule del mesotelioma per colmare le lacune intercellulari nel tessuto tumorale in via di sviluppo.

## 6.2 Crescita e invasione del cancro: interazioni eterotipiche

Prove crescenti suggeriscono che la comunicazione intercellulare tra le cellule del tumore e lo stroma circostante all'interno del microambiente tumorale è essenziale per il progresso dei tipi di cancro invasivo [126]. Hanna et al. hanno dimostrato che i TNT eterotipici tra cellule tumorali mammarie e macrofagi erano responsabili dell'induzione di una morfologia invasiva delle cellule tumorali in dipendenza dalla segnalazione del fattore di crescita epidermico e suo recettore [94]. In questo studio, gli autori hanno dimostrato che le cellule tumorali migravano preferenzialmente insieme ai macrofagi verso l'endotelio e che l'invasione delle cellule tumorali si verificava a livelli elevati in vitro e in vivo.

Le sinapsi neurogliomali (NGS) sui TM favoriscono la progressione del glioblastoma promuovendo la crescita del tumore [75]. I gliomi si integrano nelle reti elettriche e la corrente depolarizzante promuove la progressione del tumore. La sottopopolazione di cellule di glioblastoma funzionalmente collegata ai neuroni in vivo ha mostrato un potenziale invasivo significativamente più elevato rispetto ad altre cellule di glioblastoma [75]. È interessante notare che anche la comunicazione tra astrociti e neuroni svolge un ruolo durante lo sviluppo dei tessuti neurali. Sulla base di studi sulla crescita dell'ippocampo, Wang et al. ha suggerito che i neuroni utilizzino i TNT durante la loro maturazione per organizzare l'accoppiamento elettrico e per scambiare segnali di calcio con gli astrociti [59].

## 6.3 Sopravvivenza delle cellule tumorali

Osswald et al. (2015) hanno osservato un meccanismo di autoriparazione all'interno di cellule di propagazione del tumore al cervello (BTPC) collegate a TM dopo il danno fotonico causato dall'irradiazione laser letale [38]. Dopo l'ablazione di una singola cellula di glioma collegata a TM, la cellula morta è stata avvicinata da nuove TM che si estendevano dalle cellule di glioma vive circostanti. Un nuovo nucleo cellulare è stato traslocato nella cellula ablata utilizzando TM in pochi giorni. Al contrario, questo meccanismo di riparazione è stato osservato solo raramente nelle cellule ablate non collegate alla TM. **Il danno fotonico di più cellule ha portato a una rapida espansione dei TM delle cellule gliali nell'area danneggiata con un successivo miglioramento locale della densità delle cellule tumorali. Il fatto che le condizioni di stress promuovano la formazione del tubo della membrana indica che le TM rappresentano una sorta di meccanismo di sopravvivenza.** Coerentemente, l'ipossia presente in vari tipi di cancro può anche favorire la formazione di TNT. Una condizione ipossica è un segno distintivo in molti tumori solidi maligni, ad esempio, l'ipossia eleva la formazione di TNT nel cancro delle ovaie o del colon [64,108]. L'effetto più alto è stato osservato nelle cellule di cancro ovarico chemioresistenti e in particolare non è stato possibile sopprimere l'applicazione di un composto che altrimenti sopprimeva i TNT nelle cellule sensibili. Wang e Gerdes hanno scoperto che le cellule PC 12 trattate con luce UV sono state salvate quando sono state co-coltivate con cellule non trattate a causa del trasferimento dei mitocondri mediato da TNT lungo i microtubuli nel collegamento dei TNT [15] (Figura 2).

La comunicazione tra tumore e cellule stromali è cruciale per la sopravvivenza del tumore. Le cellule tumorali possono influenzare le cellule microambientali per promuovere percorsi che supportano le cellule tumorali. Oltre a ricevere i mitocondri, le cellule tumorali possono anche impiegare il trasferimento del segnale per modificare il loro microambiente, favorendo così la progressione del tumore. Polak ha riportato un segnale dalle cellule leucemiche di un linfoblastoma acuto alle cellule stromali del midollo osseo (MSC) attraverso TNT con conseguente rilascio di citochine che promuovono la sopravvivenza [103]. È stato anche osservato che le cellule stromali del midollo osseo attivate traslocano i mitocondri nelle cellule leucemiche della leucemia linfoblastica acuta (ALL) durante lo stress ossidativo [104]. Marlin et al. hanno riferito che le cellule stromali del midollo osseo traslocavano i mitocondri in blastociti di leucemia mieloide acuta (AML) da parte di TNT derivati dalle cellule leucemiche [105]. Essi mostrano che i superossidi derivati da NOX2 generati dai blastociti di leucemia mieloide acuta causano il trasferimento mitocondriale.

## 6.4. Modulazione delle cellule tumorali e dell'ambiente tramite carico mediato da TNT/TM

### 6.4.1. Trasferimento di mitocondri



I mitocondri possono essere trasferiti tra le cellule dai TNT [24,50]. Tale trasferimento di mitocondri attraverso i TNT è stato osservato tra le cellule microambientali tumorali e le cellule tumorali e tra le cellule tumorali in molti diversi tipi di cancro, tra cui mesotelioma [21], leucemia [105,127,128], carcinoma a cellule squamose [85,86], mammella [58, 93,129], vescica [92], tumori ovarici [58,108] così come nel glioblastoma [130,131]. Gli effetti metabolici dei mitocondri acquisiti sono stati dimostrati in numerosi studi in vitro. Da notare che la traslocazione mitocondriale mediata da TNT ha modificato il metabolismo energetico della cellula ricevente [93,127,132,133]. L'acquisizione dei mitocondri da parte delle cellule tumorali ha comportato un aumento del tasso di proliferazione e dell'invasività. Caicedo et al. hanno dimostrato che i mitocondri delle cellule mesenchimali staminali sono in grado di aumentare la capacità proliferativa e invasiva in una linea cellulare di cancro al seno [93]. Lu et al. hanno osservato che l'aumento del comportamento invasivo delle cellule tumorali della vescica è succeduto al traffico di mitocondri mediato da TNT tra cellule tumorali della vescica altamente invasive e cellule uroteliali meno invasive [92].

#### **6.4.2. Trasferimento di microRNA**

È stato anche riportato che i TNT facilitano il trasporto di microRNA oncogenici (miRNA) tra le cellule tumorali e tra il tumore e le cellule stromali circostanti (Figura 2) [57,83]. È stato dimostrato che il trasferimento di miRNA avviene tra il tumore e le cellule stromali circostanti del microambiente tumorale, ad es. tra cellule di osteosarcoma e osteoblasti stromali o tra cellule di cancro ovarico e cellule dell'epitelio ovarico [57]. Inoltre, il trasferimento orizzontale di miRNA tra cellule tumorali metastatiche e cellule endoteliali da parte dei TNT è stato recentemente collegato all'invasività metastatica [95]. È stato osservato che le cellule tumorali metastatiche formano prevalentemente "ponti di membrana intercellulare su scala nanometrica" simili a TNT con le cellule endoteliali [95]. Connor et al. afferma che tali tubi favorissero la comunicazione tra le cellule tumorali e le cellule endoteliali sane, trasformando così un endotelio sano in un endotelio patologico. In questo studio è stato dimostrato che le cellule di cancro al seno formano strutture simili a TNT per trasferire miRNA dal tumore all'endotelio e inducono un fenotipo patologico. Tali miRNA hanno dimostrato di funzionare come regolatori di segnalazione della migrazione e dell'invasione delle cellule tumorali [134,135].

#### **6.4.3. Trasferimento di Oncogeni**

Recentemente è stato dimostrato che il trasferimento dell'oncogene RAS KRAS tra le cellule può essere mediato da TNT di cellule tumorali del colon [97]. Tale traslocazione intercellulare di oncogeni si traduce in una distribuzione eterogenea di KRAS mutante nelle cellule con KRAS endogeno di tipo selvaggio. KRAS, uno degli oncogeni più frequentemente mutati nel cancro, è noto per agire come una forza trainante fondamentale nei tumori come il cancro del colon-retto e del pancreas [136,137,138]. La segnalazione di KRAS oncogenica modula profondamente l'ambiente tumorale, comprese le risposte del sistema immunitario verso il tumore, i fibroblasti associati al cancro e le risposte angiogenetiche [139]. Quindi l'amplificazione della diffusione oncogenica di KRAS tramite la traslocazione mediata da TNT può avere importanti conseguenze per la progressione del tumore, il che implica che i TNT hanno il potenziale per riprogrammare le cellule maligne e alterare le cellule nell'ambiente tumorale.

#### **6.4.4. Trasferimento di esosomi e altri carichi**

TNT ed esosomi possono lavorare in sinergia. Nelle cellule del mesotelioma umano è stato dimostrato che gli esosomi tumorali esogeni inducono una maggiore formazione di TNT come ulteriori metodi di trasporto intercellulare [83]. Come mostrato dalla microscopia elettronica, gli esosomi si sono accumulati alla base dei TNT e anche extracellulare, suggerendo che gli esosomi possono agire come un potente stimolo chemiotattico per la formazione e la guida del TNT (Figura 2).

#### **6.5. Angiogenesi**

L'angiogenesi è un segno distintivo dei tumori. L'interruttore angiogenico è un processo attraverso il quale le cellule tumorali sviluppano un fenotipo angiogenico, avviando così l'angiogenesi [140,141,142,143]. Lo studio di Errede et al. implica un ruolo primario dei TNT nell'angiogenesi tumorale [102]. È stato ipotizzato

che i TNT possano promuovere l'angiogenesi stabilendo contatti tra periciti ma anche tra periciti e cellule endoteliali (Figura 2). È stato scoperto che i periciti formano TNT, indicando i periciti come la fonte primaria di TNT per inizializzare e favorire la crescita e la ramificazione dei vasi nel glioblastoma e nella corteccia cerebrale in via di sviluppo. È stato osservato che TNT ultra lunghi simili a TM collegano le pareti di vasi distanti e TNT corti per collegare tra loro vasi germogliati giustapposti o un vaso che germoglia con il suo vaso di fronte. È stato anche dimostrato che i TNT che collegavano le cellule endoteliali microvascolari umane contengono goccioline lipidiche. Queste goccioline lipidiche sono state in grado di aumentare di numero dopo il trattamento con VEGF, seguito dall'attivazione di alcuni segnali [144]. Ciò porta ad una maggiore motilità cellulare e ad un'ulteriore formazione di TNT.

## **6.6. Resistenza al trattamento**

Per i tumori invasivi come il glioblastoma, l'attuale terapia standard consiste in una combinazione di chirurgia, radioterapia e chemioterapia, ma il successo terapeutico rimane scarso [145]. Ciò è dovuto al fatto che TNT e TM contribuiscono alla resistenza al trattamento stabilendo reti tra le cellule tumorali. Tali reti possono estendersi al tessuto circostante il tumore, aumentando così il suo potenziale maligno.

### **6.6.1. Resistenza alle lesioni chirurgiche**

La rete di glioblastoma collegata a TM è stata in grado di ripararsi da sola quando è stata eseguita un'escissione chirurgica laser. In un modello di cellule di propagazione del tumore al cervello (BTPC) derivate dal paziente impiantate per via intracranica nei topi, Weil et al. ha dimostrato che le cellule di glioblastoma formavano ed estendevano più TM verso l'area lesa [87]. Questo studio ha dimostrato che una lesione chirurgica è in grado di innescare un ripopolamento eccessivo della lesione con cellule di glioblastoma mediate da TM [87]. Ciò è supportato dalla scoperta che la densità delle cellule tumorali ha superato significativamente le parti non lesionate del cervello. Coerentemente, è stato dimostrato che la maggior parte dei tumori, pur colonizzando il margine di resezione, riappaiono al margine di resezione. Inoltre, il targeting genetico di proteine coinvolte nella formazione di TM potrebbe sopprimere la crescita del tumore dopo l'intervento chirurgico compromettendo la formazione e la funzione dei TM e quindi potrebbe ridurre la recidiva del tumore dopo l'intervento chirurgico mediante il ripopolamento.

### **6.6.2. Resistenza alla chemioterapia**

È stato osservato che gli agenti chemioterapici hanno il potenziale di influenzare la formazione di TNT e il traffico di merci. È stato dimostrato che i TNT/TM mediano la chemioresistenza, ad esempio, nelle cellule del cancro ovarico e mammario [58,108], nelle cellule del cancro del pancreas [84], nelle cellule della leucemia [104,106,127] e nelle cellule del glioblastoma [87]. Desiderio et al. hanno dimostrato che le cellule di cancro ovarico chemioresistenti formavano più TNT rispetto alle cellule chemiosensibili quando lo stress ossidativo veniva sottoposto alle cellule [108]. Pasquier et al. hanno osservato la traslocazione mitocondriale dalle cellule endoteliali alle cellule tumorali tramite TNT e presumono che la chemioresistenza sia associata a tale traffico mitocondriale [58]. Questa scoperta può essere supportata da rapporti sulle cellule di cancro al seno MCF7 che hanno mostrato un'elevata resistenza alla doxorubicina dopo aver ricevuto i mitocondri dalle cellule endoteliali. Risultati simili sono stati osservati per le neoplasie ematopoietiche. Wang et al. hanno mostrato che il trasferimento di mitocondri supportava la chemioresistenza indotta dalle cellule staminali mesenchimali nelle cellule di leucemia linfoblastica acuta a cellule T a causa della riduzione dei livelli di ROS [106]. Moschoi et al. hanno dimostrato che il trasferimento mitocondriale dalle cellule stromali derivate dal midollo osseo può proteggere le cellule leucemiche mieloidi acute (LMA) quando esposte a chemioterapia [127]. In questo studio, la citarabina (ARA) ha aumentato la comunicazione e il traffico di cellule leucemiche con cellule mesenchimali staminali derivate dal midollo osseo mediante l'incorporazione dei mitocondri nelle cellule leucemiche.

Allo stesso modo, le cellule mesenchimali staminali attivate dalla chemioterapia sono state in grado di prevenire l'apoptosi nelle cellule leucemiche linfoblastiche acute (ALL) durante la terapia utilizzando TNT per trasferire i mitocondri [104]. Di conseguenza, la riduzione del traffico mitocondriale può impedire questo effetto di salvataggio.

Come i TNT, anche i TM contribuiscono alla resistenza alla chemioterapia, come si vede nelle cellule tumorali collegate tra loro dai TM e nei tumori con abbondanti TM che hanno mostrato una maggiore resistenza al trattamento con temozolamide [87]. I meccanismi di questo beneficio di sopravvivenza dopo la chemioterapia di cellule di glioblastoma collegate da numerose TM rispetto a cellule tumorali che non erano collegate tra loro da TM non sono del tutto chiare. La diffusione intercellulare dei fattori regolatori da parte dei tubi a membrana potrebbe essere considerata una chiave nello sviluppo della resistenza alla chemioterapia. Gli autori hanno ipotizzato che la rete di cellule tumorali possa favorire un'ampia diffusione di agenti chemioterapici, prevenendo così concentrazioni temporanee critiche elevate di farmaci. Ciò è supportato dal fatto che le TM che collegano le cellule di glioma e attraversano le TM intercellulari contengono numerose giunzioni gap Cx43 [38]. Tale comunicazione giunzionale tra astrociti e cellule di glioma può proteggere il tumore anche dalla chemioterapia [146,147]. Pertanto è anche possibile che cellule non maligne stabiliscano connessioni di giunzione gap con cellule di glioblastoma per partecipare a questa rete protettiva. In conclusione, il sincizio funzionale che è stabilito da abbondanti connessioni TM tra le cellule di glioma e il microambiente tumorale fornisce protezione contro la chemioterapia.

### **6.6.3. Resistenza alla radioterapia**

Le cellule di glioma collegate da TM hanno anche dimostrato di essere più robuste e mostrano tassi di sopravvivenza più elevati sotto radioterapia standard, presumibilmente perché la rete TM promuove un'omeostasi multicellulare più stabile [38]. Le cellule collegate alla TM hanno aumentato il loro numero di TM e quindi la diffusione comunicativa del calcio. Coerentemente, il knockdown di una delle proteine delle giunzioni gap, la Cx43, ha compromesso l'effetto radioprotettivo della rete TM. È interessante notare che solo le cellule di glioma prive di TM e non collegate sono morte in numero rilevante dopo la radioterapia. La radioterapia è stata in grado di indurre la morte cellulare nelle cellule di glioma prive di TM e quindi non collegate disturbando l'equilibrio intracellulare di calcio libero rispetto alle cellule non irradiate e collegate a TM che hanno sostenuto livelli omogenei di calcio libero intracellulare durante l'irradiazione. Un altro studio ha dimostrato che un aumento del calcio libero intracellulare è un evento chiave nell'induzione della fase di esecuzione dell'apoptosi [148]. Osswald et al. ha suggerito che la rete intercellulare TM fungesse da distributore di calcio che impedisce aumenti critici di calcio intracellulare libero in una singola cellula tumorale per sostenere livelli non letali, prevenendo così gli effetti citotossici dell'irradiazione e la successiva apoptosi nelle cellule di glioma [38]. Nella revisione di Matejka e Reindl si sono concentrati in particolare sul ruolo dei TNT nella risposta alle radiazioni delle cellule al trattamento con radiazioni utilizzando raggi X e trattamento con particelle alfa [65].

## **7. Conclusioni e prospettive**

TNT e TM si sono i nuovi mediatori della comunicazione intercellulare. I dati in vitro hanno rivelato il loro potenziale per l'insorgenza e la progressione dei tumori formando reti di comunicazione all'interno del microambiente tumorale che aumentano la malignità consentendo la distribuzione del potenziale metastatico. Inoltre, recenti scoperte hanno rivelato che le cellule di glioma sono in grado di formare TNT/TM in vivo in correlazione con il potenziale metastatico del tumore e hanno dimostrato che i neuroni possono formare contatti sinaptici con TNT/TM dalle cellule tumorali. La perturbazione farmacologica dei TNT/TM ha di conseguenza ridotto il potenziale metastatico dei tumori in vivo in modelli sperimentali di metastasi. Pertanto, l'interruzione delle connessioni TNT/TM ha il potenziale per ridurre la resistenza e i tassi di recidiva del cancro disconnettendo farmacologicamente le reti tumorali. D'altra parte, i TNT/TM offrono potenziali condotti cellulari per la somministrazione di farmaci e quindi l'amplificazione degli effetti dei farmaci mirati al cancro. Mentre i primi studi su TNT/TM sono stati condotti in vitro, sono emersi progetti di studio più sofisticati che coinvolgono tumori ex vivo e infine studi in vivo su modelli animali. Sebbene le conoscenze sui TNT/TM siano aumentate negli ultimi anni, molti aspetti complessi e intriganti restano da chiarire. Ad esempio, l'identificazione di marcatori molecolari per TNT/TM in vivo rimane una sfida importante per comprendere la funzione di TNT/TM. L'esplorazione di come si connettono TNT/TM, come supportano la comunicazione intercellulare o come sono regolati temporalmente e spazialmente, è emersa come una questione essenziale per comprendere la comunicazione intercellulare e l'interazione tra le cellule tumorali e il

loro microambiente. L'esplorazione di questi aspetti fornirà informazioni chiave sulla regolazione della progressione del cancro.