

**Titolo:** L'espressione del recettore della prolattina a forma lunga è associata a una minore sopravvivenza libera da malattia e globale nei pazienti con carcinoma mammario con linfonodi negativi - Expression of long-form prolactin receptor is associated with lower disease-free and overall survival in node-negative breast cancer patients

**Codice:** PRL005

**Autore:** Sa-nguanraksa et al.

**Data:** 2021

**Rivista:** Gland Surgery 10(1):130-142

**Argomento:** prolattina

**Accesso libero:** si

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.21037/gS-20-569>

**URL:** <https://gs.amegroups.com/article/view/57737/html>

**BLOG:** <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2021/09/07/prl005-sa-nguanraksa-et-al-2021/>

**Parole chiave:** tumore al seno; immunoistochimica; recettore della prolattina a isoforma lunga; recettore della prolattina (PRLR)

**Tumore:** cancro al seno

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

### **Punti di interesse**

Per questo studio sono state reclutate 340 pazienti con cancro al seno (diverse tipologie), per studiare la presenza delle diverse forme del recettore della prolattina e la loro eventuale correlazione con parametri clinico-patologici. Sono state individuate cinque diverse isoforme del recettore della prolattina, legate alla membrana della cellula. I recettori della prolattina legati alla membrana cellulare comprendono una forma lunga (LF-PRLR), una forma intermedia, una forma  $\Delta S1$  e due forme brevi (SF-PRLR). Tutte queste isoforme, cosiddette all-PRLR, condividono la parte fuori dalla cellula (dominio extracellulare - ECD), ma sono differenti nella parte che si trova all'interno della cellula (dominio intracellulare - ICD). La forma lunga (LF-PRLR) e le forme brevi (SF-PRLR) stimolano vie di segnalazione diverse, e quindi determinano effetti diversi quando attivati dal legame con il ligando, in questo caso la prolattina. Con la scissione (distacco) del dominio extracellulare si forma una forma solubile del PRLR. In questo studio sono state usate tecniche di colorazione immunoistochimica per individuare in modo generico i recettori della PRL (senza distinzione delle varie isoforme, quindi quelli indicati dalla sigla all-PRLR) e in modo specifico per individuare la isoforma a forma lunga del recettore (LF-PRLR).

I risultati dello studio indicano che l'86% dei tessuti analizzati presentava il recettore della prolattina e il 54,4% presentava la forma lunga (LF-PRLR). Il recettore della prolattina è frequentemente co-espresso con il recettore per gli estrogeni (ER) e il recettore per il progesterone (PR). L'elevata espressione di all-PRLR era inversamente associata a carcinoma scarsamente

differenziato (l'espressione di all-PRLR negativa o bassa era associata a un tumore di dimensioni maggiori e a un tumore scarsamente differenziato). LF-PRLR è anche spesso co-espresso con il recettore per gli estrogeni (ER) e il recettore per il progesterone (PR). L'espressione di LF-PRLR era associata a un tumore di alto grado e alla sovraespressione del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2). Questo è il primo rapporto che ha trovato la co-espressione di LF-PRLR e HER2. Il possibile meccanismo potrebbe essere spiegato dalla transattivazione tra PRL/PRLR e segnalazione di HER2. LF-PRLR esercita la segnalazione tramite il dominio intracellulare che agisce come la vera e propria unità di segnalazione del recettore. Il residuo distale del recettore è cruciale determina fosforilazione di JAK2 e STAT5. Quindi l'attivazione della isoforma a forma lunga del recettore della prolattina porta alla trascrizione di geni bersaglio legati alla proliferazione cellulare, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare nel cancro al seno. L'attivazione di altre forme del recettore della prolattina determina l'attivazione di altre vie di segnalazione e processi biologici, in quanto differiscono nel dominio intracellulari.

## Traduzione articolo

### Riassunto

**Contesto:** il cancro al seno è il tumore maligno femminile più frequente in Thailandia. La prolattina (PRL) e il recettore della prolattina (PRLR) svolgono un ruolo importante nel normale sviluppo del seno e nella carcinogenesi del cancro al seno. Esistono due isoforme principali di PRLR, costituite da forma lunga (LF-PRLR) e forma breve (SF-PRLR) che stimolano diverse vie di segnalazione. Questo studio mira a esplorare le associazioni tra tutte le isoforme PRLR (all-PRLR) e la forma lunga del recettore (LF-PRLR) con parametri clinicopatologici nei pazienti con cancro al seno.

**Metodi:** Un totale di 340 pazienti sono stati reclutati da gennaio 2009 a dicembre 2015. Le espressioni di PRLR nel tessuto del cancro al seno sono state determinate mediante immunoistochimica utilizzando anticorpi specifici che riconoscono diversi domini di PRLR (B6.2 per all-PRLR e H-300 per LF -PRLR). Sono state valutate le associazioni tra tutte le espressioni PRLR e LF-PRLR con parametri clinicopatologici.

**Risultati:** l'espressione di tutte le forme PRLR è stata osservata nell'86,2% di tutti i pazienti mentre l'espressione di LF-PRLR è stata osservata nel 54,4%. All-PRLR è stato co-espresso con il recettore per gli estrogeni (ER) e il recettore per il progesterone (PR). L'espressione di LF-PRLR era associata a un tumore di alto grado e alla sovraespressione del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2) ( $P=0.010$  e  $<0.001$ , rispettivamente). L'analisi dei sottogruppi ha rivelato che l'espressione di LF-PRLR era il predittore indipendente di una sopravvivenza libera da malattia (DFS) inferiore in pazienti con carcinoma mammario con linfonodi negativi con alta espressione di tutte le PRLR [rapporto di rischio (HR): 5,224, intervallo di confidenza al 95% (CI): 1,089–25,064,  $P=0,039$ ].

**Conclusioni:** la presenza di LF-PRLR nei pazienti con alta espressione di tutte le forme del PRLR è stata associata a esiti avversi. La valutazione di all-PRLR e LF-PRLR potrebbe essere utilizzata come nuovi fattori prognostici nei tumori al seno con linfonodi negativi.

### Introduzione

Il cancro al seno è il tumore maligno più frequente nelle donne in tutto il mondo (1). L'incidenza di questa malattia è in aumento in Thailandia ed è anche la principale causa di mortalità per cancro (2). Il normale sviluppo del seno e la cancerogenesi del cancro al seno sono controllati da diverse proteine. I principali modulatori della proliferazione e differenziazione delle cellule epiteliali mammarie sono la prolattina (PRL) e il recettore della prolattina (PRLR) (3).

PRLR appartiene alla famiglia dei recettori delle citochine di classe I. PRLR si localizza sul

cromosoma 5 (p13-14) e contiene almeno 10 esoni con una lunghezza complessiva di oltre 100 kilobasi (4). Lo splicing alternativo dell'mRNA determina cinque diverse isoforme legate alla membrana e la scissione proteolitica del dominio extracellulare (ECD) risulta in una forma solubile di PRLR (4). Le forme legate alla membrana comprendono una forma lunga (LF-PRLR), una forma intermedia, una forma  $\Delta S1$  e due forme brevi (SF-PRLR). Tutte queste isoforme, cosiddette all-PRLR, condividono un dominio extracellulare (ECD) comune ma sono differenti nel loro dominio intracellulare (ICD) (5). LF-PRLR, un peptide da 80-85 kDa, svolge un ruolo importante nella segnalazione PRLR tramite l'attivazione di diverse vie di segnalazione a valle che promuovono la proliferazione cellulare, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare. Si ritiene che LF-PRLR eserciti il ruolo principale nella segnalazione della PRL (6). La PRLR a isoforma intermedia attiva la via JAK/STAT e regola la sopravvivenza cellulare ma non la proliferazione (7). Al contrario, SF-PRLR inibisce la trasduzione del segnale di MAPK (8).

La PRLR è stata implicata nella patogenesi del cancro al seno e anche alla prostata (9). I test RT-PCR e immunoistochimici hanno mostrato che l'mRNA e la proteina PRLR erano altamente espressi nel tessuto del cancro al seno rispetto al tessuto normale del seno (10,11). Il legame della PRL con la PRLR determina la stimolazione della proliferazione, migrazione e sopravvivenza delle cellule del cancro al seno (5). La co-espressione di PRL e PRLR nelle cellule del cancro al seno crea un ciclo di crescita e sopravvivenza autocrino/paracrino (12). Tuttavia, il ruolo della segnalazione PRL/PRLR nel cancro al seno è ancora controverso. L'assenza di espressione di PRLR è stata associata a tumori scarsamente differenziati e più grandi (13). Un'elevata espressione di LF-PRLR è stata associata a carcinoma da ben a moderatamente differenziato, linfonodi negativi e sopravvivenza libera da metastasi prolungata (14). Al contrario, l'abbattimento specifico di LF-PRLR nel modello murino ha provocato l'inibizione delle metastasi polmonari. Inoltre, l'abbattimento in vitro dell'LF-PRLR ha inibito la formazione di colonie e ha indotto l'apoptosi delle cellule tumorali. Questa evidenza ha indicato il ruolo di LF-PRLR nel promuovere le metastasi del cancro al seno (15).

Poiché il ruolo di LF-PRLR nella biologia del cancro al seno è relativamente sconosciuto, l'obiettivo di questo studio è esplorare le associazioni tra tutte le forme del recettore della prolattina (all-PRLR) e la isoforma a forma lunga (LF-PRLR) con parametri clinicopatologici e risultati di sopravvivenza in diversi sottotipi di cancro al seno.

## Discussione

Diversi studi di associazione tra PRLR ed esiti clinicopatologici del cancro al seno sono stati limitati a causa dei diversi metodi di rilevamento e della mancanza di un sistema di punteggio standard. Pertanto, abbiamo deciso di determinare l'espressione differenziale delle isoforme PRLR, LF-PRLR, in particolare, e l'associazione con l'aggressività del cancro al seno. Abbiamo eseguito la colorazione immunoistochimica utilizzando due anticorpi primari per rilevare diverse isoforme di PRLR che stimolano particolari vie di segnalazione a valle.

L'espressione di tutti i PRLR è stata trovata nella maggior parte dei tumori al seno secondo uno studio precedente (11,13). Diversi studi immunoistochimici del recettore della PRL nel tessuto mammario normale, benigno e canceroso hanno rivelato risultati diversi a causa della mancanza di un protocollo di colorazione immunoistochimica PRLR e di un sistema di punteggio standard (11,14). Uno studio di Gill et al. utilizzando l'anticorpo B6.2 che lega il dominio extracellulare (ECD) di tutte le forme del PRLR ha mostrato che all-PRLR è stato espresso in tutto il tessuto mammario normale con varia intensità, tuttavia, l'espressione è stata osservata nei bordi luminari delle cellule epiteliali. Nel carcinoma mammario invasivo, l'espressione di tutti i PRLR è stata osservata in più di due terzi dei pazienti e la colorazione era per lo più citoplasmatica (11).

Nel presente studio, è stata osservata la co-espressione dei recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR) e PRLR in accordo con i rapporti precedenti (11,17). Un aumento

dell'espressione di PRLR è stato osservato anche in linee cellulari di carcinoma mammario luminale trattate con estrogeni (17). PRL induce l'espressione di PRLR attraverso il reclutamento di ER e STAT5 sul promotore di PRLR (18). Abbiamo anche scoperto che l'espressione di tutte le forme di PRLR era associata a un tumore ben/moderatamente differenziato. La scoperta era concordante con uno studio di Faupel-Badger et al., che utilizzava anticorpi specifici per il dominio extracellulare di tutti i PRLR. Hanno scoperto che l'espressione di tutti i PRLR negativa o bassa era associata a un tumore di dimensioni maggiori e a un tumore scarsamente differenziato (13). Al contrario, l'espressione di LF-PRLR era associata a carcinoma scarsamente differenziato e sovraespressione di HER2. Questo risultato era in disaccordo con lo studio di Hachim et al. che utilizzava l'anticorpo H-300 specifico per LF-PRLR. Hanno scoperto che l'espressione di LF-PRLR è downregolata nel carcinoma mammario invasivo e l'espressione era associata a parametri clinicopatologici favorevoli (14). Tuttavia, la colorazione è stata eseguita in un TMA acquistato in commercio che comprendeva un piccolo numero di pazienti (84 carcinomi invasivi).

L'associazione tra LF-PRLR e sopravvivenza libera da malattia inferiore può essere dimostrata in un sottogruppo di pazienti con carcinoma mammario con linfonodi negativi con elevata espressione di tutte le PRLR. Il significato dell'espressione di LF-PRLR non può essere dimostrato indipendentemente dallo stato del nodo ascellare. Questo risultato potrebbe essere dovuto all'impatto del coinvolgimento dei linfonodi ascellari sulla sopravvivenza del cancro al seno (19). LF-PRLR esercita capacità di segnalazione tramite il dominio intracellulare che agisce come unità di segnalazione del recettore (20, 21). Il residuo distale del recettore è cruciale per il legame e l'attivazione di STAT5 (22). LF-PRLR promuove la proliferazione cellulare, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare nel cancro al seno. L'omodimerizzazione di LF-PRLR attiva la fosforilazione di JAK2 e STAT5 e successivamente la trascrizione dei geni bersaglio mentre l'eterodimerizzazione di LF-PRLR e SF-PRLR o l'omodimerizzazione di SF-PRLR attiva la fosforilazione di JAK2 ma non ha portato alla trascrizione (23). La neutralizzazione della PRLR da parte dell'anticorpo monoclonale ha portato alla riduzione della segnalazione del LF-PRLR, inibendo la crescita del tumore (24). La valutazione delle diverse isoforme della PRLR potrebbe essere utile per la selezione dei pazienti che riceveranno l'anticorpo monoclonale neutralizzante.

Nello studio attuale, il 70% dei pazienti con sovraespressione di HER2 aveva un'espressione LF-PRLR. Per quanto a nostra conoscenza, questo è il primo rapporto che ha trovato la co-espressione di LF-PRLR e HER2. Il possibile meccanismo potrebbe essere spiegato dalla trans attivazione tra PRL/PRLR e segnalazione di HER2 (25). Il blocco combinato della segnalazione PRL/PRLR e HER2 potrebbe essere una modalità alternativa per questo gruppo di pazienti che presentavano resistenza anti-HER2 (26).

Rispetto ad altri sottotipi di cancro al seno, l'espressione di PRLR è stata sottoregolata nel cancro al seno triplo negativo. Questo risultato era in accordo con il precedente studio di López-Ozuna et al. che ha riportato la sotto regolazione della PRLR nel carcinoma mammario triplo negativo (27). La segnalazione PRL/PRLR era associato a un esito favorevole della sopravvivenza nel carcinoma mammario triplo negativo (27,28). Il ripristino della via di segnalazione PRL/PRLR nella linea cellulare di carcinoma mammario triplo negativo può ridurre la vitalità cellulare e l'aggressività delle cellule tumorali (27). Tuttavia, non vi era alcuna associazione tra l'espressione di PRLR nel sottotipo triplo negativo e gli esiti clinico patologici nel nostro studio attuale a causa del piccolo numero di pazienti con cancro al seno triplo negativo. Inoltre, il targeting della via PRL/PRLR per il trattamento del cancro al seno potrebbe essere vantaggioso in una piccola percentuale di pazienti con cancro al seno triplo negativo a causa della bassa espressione di PRLR in questo sottotipo. I limiti di questo studio includono il reclutamento di una popolazione eterogenea di cancro al seno che si traduce in una distribuzione ineguale del cancro al seno in particolari sottotipi. Ulteriori studi che determinano il significato di LF-PRLR nel cancro al seno con sovraespressione di HER2

potrebbero portare alla nuova terapia mirata combinata per i pazienti con cancro al seno con sovraespressione di HER2.

#### Conclusioni

Abbiamo dimostrato che l'espressione di all-PRLR e LF-PRLR nel carcinoma mammario in fase iniziale era associata a una sopravvivenza sfavorevole. L'espressione di LF-PRLR era associata a cancro al seno scarsamente differenziato e con sovraespressione di HER2. LF-PRLR era il fattore predittivo indipendente per una sopravvivenza libera da malattia inferiore nei pazienti con carcinoma mammario con linfonodi negativi. Abbiamo proposto che LF-PRLR possa essere utilizzato come potenziale bersaglio per il trattamento del cancro al seno.