

Titolo: “Effetto sinergico della soppressione cronica della prolattina e del trattamento con retinoidi nella profilassi della tumorigenesi mammaria indotta da N-metil-N-nitrosourea in cavie femmina Sprague Dawley - Synergistic Effect of Chronic Prolactin Suppression and Retinoid Treatment in the Prophylaxis of N-Methyl-N-nitrosourea induced Mammary Tumorigenesis in Female Sprague-Dawley Rats.”

Codice: RET008

Autore: Welsch et al.

Data: 1980

Rivista: Cancer Research 40(9):3095-8

Argomento: Retinoidi, Prolattina

Accesso libero: si

DOI: PMID: 6893571

URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/40/9/3095/485023/Synergistic-Effect-of-Chronic-Prolactin>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/03/26/ret008-welsch-et-al-1980/>

Parole chiave: vitamina A, retinoidi, retinil acetato, prolattina, carcinoma mammario, sinergismo

Tumore: tumore mammario

Traduzione: l'articolo è stato tradotto in tutte le sue sezioni, traduzione fedele.

**Punti di interesse:** I retinoidi avevano già richiamato tanta attenzione per il loro utilizzo sperimentale per la chemioprevenzione della carcinogenesi negli anni settanta. Gli analoghi della vitamina A si erano dimostrati molto efficaci nel sopprimere l'incidenza di un certo numero di neoplasie epiteliali sperimentali. Allo stesso modo era già chiaro che la prolattina fosse un ormone importante per lo sviluppo di carcinomi mammari indotti sperimentalmente, in quanto la soppressione di questo ormone indotta da farmaci, subito dopo il trattamento cancerogeno, si traduceva in una significativa riduzione dell'incidenza del tumore. Un'interazione tra trattamento con retinoidi e terapia endocrina non era stata ancora studiata. Pertanto, lo scopo di questo studio era quello di accertare se la prolattina fosse importante o meno nella genesi dei carcinomi mammari nelle cavie indotti dal cancerogeno MNU e se la soppressione cronica della prolattina in combinazione con il trattamento con retinoidi fosse più efficace di entrambi i trattamenti somministrati singolarmente.

Dopo aver trattato cavie da laboratorio con due dosaggi diversi del cancerogeno MNU, il trattamento cronico con la bromocriptina (alcaloide dell'ergot - CB-154), o l'alimentazione con acetato di retinile ha ridotto notevolmente la percentuale di topi portatori di tumori mammari e il numero totale di tumori mammari. I trattamenti combinati (soppressione della prolattina e retinoidi) sono stati superiori a entrambi i trattamenti somministrati singolarmente. La tumorigenesi mammaria è stata quasi completamente bloccata nei topi che hanno ricevuto la dose maggiore di MNU ed è stata totalmente bloccata nei topi che hanno ricevuto la dose minore di cancerogeno.

Gli autori ritengono che nessuno aveva mai tentato di migliorare l'efficacia antitumorigena dell'alimentazione con retinoidi mediante terapia endocrina concomitante. È chiaro dai risultati

dello studio che si verifica un sinergismo tra questi 2 tipi nettamente diversi di modalità terapeutiche. È anche evidente che l'effetto antitumorigenico della modalità combinata è efficace solo durante i trattamenti; alla cessazione dei trattamenti, il tasso di sviluppo del tumore mammario è paragonabile a quello dei topi di controllo alimentati con placebo.

Gli autori, avendo constatato che le cavie trattate con retinoidi evidenziavano una lieve insalubrità causata dalla tossicità del retinil acetato (code squamose, mantelli ruvidi, fegati pallidi, minor peso), concludono l'articolo affermando che “una volta che questi analoghi saranno sviluppati e si noteranno progressi in questo settore, le terapie combinate endocrine e retinoidi nella profilassi della carcinogenesi mammaria nell'uomo potrebbero essere una realtà.”

Traduzione articolo

### Riassunto

**Duecentoquaranta cavie Sprague-Dawley sono stati trattati i.v. con 2,5 o 1,25 mg di N-metil-N-nitrosourea (MNU) per 100 g di peso corporeo a 50 e 57 giorni di età. A 60 giorni di età, le cavie trattate con entrambe le dosi sono stati divisi in 4 gruppi (30 topi/gruppo) e trattate come segue: Gruppo 1, controlli; Gruppo 2, 0,4 mg di 2-bromo- $\alpha$ -ergocriptina (CB-154) per 100 g di peso corporeo iniettati s.c. una volta al giorno; Gruppo 3, acetato di retinile (328 mg/kg di dieta) somministrato giornalmente; e trattamenti di Gruppo 4, CB-154 e acetato di retinile combinati. Le cavie che hanno ricevuto la dose di 2,5 mg di MNU sono state trattate per 129 giorni; quelle che hanno ricevuto la dose di 1,25 mg di MNU sono state trattate per 175 giorni. Le cavie trattate con l'alta dose di MNU sono state mantenute senza alcun trattamento per ulteriori 13 settimane, dopodiché sono state sacrificate. Le cavie che sono state trattate con la bassa dose del cancerogeno sono state sacrificate immediatamente dopo il trattamento. Tutti le cavie sono state palpate una volta alla settimana per tumori mammari palpabili. Il numero di cavie con tumori mammari e il numero totale di tumori mammari alla cessazione dei trattamenti erano, rispettivamente, i seguenti. MNU (2,5 mg): Gruppo 1, 22 su 30 (73%), 82; Gruppo 2, 11 su 30 (37%), 17; Gruppo 3, 11 su 30 (37%), 19; Gruppo 4, 2 su 30 (7%), 2. MNU (1,25 mg): Gruppo 1, 8 su 30 (27%), 14; Gruppo 2, 4 su 30 (13%), 5; Gruppo 3, 3 su 30 (10%), 4; Gruppo 4, 0 su 30, (0%), 0. Pertanto, il trattamento cronico con CB-154 o l'alimentazione con acetato di retinile ha ridotto notevolmente la percentuale di cavie portatori di tumori mammari e il numero totale di tumori mammari. I trattamenti combinati sono stati superiori a entrambi i trattamenti da soli, in quanto la tumorigenesi mammaria è stata quasi completamente bloccata nei topi del Gruppo 4 che hanno ricevuto la dose di 2,5 mg di MNU ed è stata totalmente bloccata nei topi del Gruppo 4 che hanno ricevuto la dose di 1,25 mg. di MNU. L'alimentazione con acetato di retinile o la soppressione della prolattina indotta da CB-154 sembrano essere trattamenti ugualmente efficaci nella profilassi della tumorigenesi mammaria indotta da MNU nelle cavie; la modalità combinata, tuttavia, sembra essere di gran lunga superiore rispetto a entrambi i trattamenti da soli.**

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, una maggiore attenzione è stata rivolta verso l'uso sperimentale dei retinoidi per la chemioprevenzione della carcinogenesi. Gli analoghi della vitamina A sono stati molto efficaci nel sopprimere l'incidenza di un certo numero di neoplasie epiteliali sperimentali (7), inclusi i carcinomi mammari indotti da MNU3 e DMBA nei roditori (2, 3, 8). I retinoidi sono più efficaci se usati subito dopo il trattamento cancerogeno; sembrano quindi agire principalmente a livello della neoplasia incipiente e non sono particolarmente efficaci quando somministrati ad animali in stadi avanzati di malattia.

La prolattina è un ormone importante per lo sviluppo di carcinomi mammari indotti da idrocarburi policiclici nei topi, in quanto la soppressione indotta da farmaci di questo ormone subito dopo il trattamento cancerogeno si traduce in una significativa riduzione dell'incidenza del tumore (9, 12). L'effetto di questo peptide ipofisario sulla genesi dei carcinomi mammari di topo indotti da MNU, un modello sviluppato di recente che secondo quanto riferito è più simile al carcinoma mammario umano rispetto al modello di topo con idrocarburi policiclici (1), non è stato riportato. Pertanto, lo scopo di questo studio è accertare se la prolattina sia importante o meno nella genesi dei carcinomi mammari del topo indotti da MNU e, in tal caso, se la soppressione cronica della prolattina in combinazione con il trattamento con retinoidi sarà più efficace di entrambi i trattamenti da soli. Un'interazione tra trattamento con retinoidi e terapia endocrina non è stata finora studiata, sebbene sia stata segnalata una relazione inversa tra recettori steroidei e recettori retinoidi nei tumori ovarici dipendenti e non-indipendenti (4).

## MATERIALI E METODI

Duecentoquaranta topi Sprague-Dawley femmine (Spartan Research Animals, Inc., Haslett, Mich.) sono stati divisi in 8 gruppi, alloggiati in una stanza a temperatura controllata ( $24 \pm 10$ ) e luce controllata (14 ore al giorno), e dato una dieta di farina di laboratorio Wayne (Allied Mills, Inc., Chicago, Illinois) e acqua ad libitum. Il contenuto di vitamina A del pasto di laboratorio Wayne è di 15 UI di vitamina per g di razione. Tutti i topi sono stati trattati i.v. con 1,25 o 2,5 mg di MNU per 100 g di peso corporeo a 50 e 57 giorni di età. MNU (Ash Stevens, Inc., Detroit, Michigan) è stato sciolto in una soluzione di NaCl allo 0,9% (10 mg/ml) acidificata (pH da 4 a 5) con acido acetico. La secrezione di prolattina ipofisaria è stata soppressa da iniezioni s.c. di CB-154 (0,4 mg/100 g di peso corporeo) a partire dai 60 giorni di età. La soluzione di CB-154 è stata preparata sciogliendo l'alcaloide dell'ergot in una quantità minima di etanolo al 100% e diluendo con una soluzione di NaCl allo 0,9% in modo che la concentrazione finale fosse di 2,0 mg di CB-154 per ml.

Ai topi di controllo e ai topi alimentati con la sola dieta a base di retinoidi sono state somministrate iniezioni giornaliere solo del diluente. Il trattamento con retinoidi è stato iniziato a 60 giorni di età ed è stato realizzato miscelando retinil acetato nella dieta di riserva sotto forma di perline gelatinizzate stabili ad una concentrazione di 328 mg di retinil acetato per kg di dieta. Topi di controllo e topi trattati con CB-154 da soli sono stati alimentati con perline gelatinizzate senza acetato di retinile. I topi che hanno ricevuto la dose di 1,25 mg di MNU (gruppi da 5 a 8) sono stati trattati per 175 giorni e poi sono stati sacrificati. I topi che hanno ricevuto la dose di 2,5 mg di MNU (gruppi da 1 a 4) sono stati trattati per 129 giorni; il trattamento è stato quindi interrotto e i topi sono stati mantenuti su un cibo per topi standard (Wayne Lab-Blox) per un periodo di 13 settimane.

A partire da 1 mese dopo il trattamento cancerogeno, tutti i topi sono stati pesati e palpato una volta alla settimana per i tumori mammari. Il sangue è stato ottenuto da ciascun topo nei gruppi da 5 a 8 mediante decapitazione e analizzato mediante dosaggio radioimmunologico per la prolattina (kit per il dosaggio radioimmunologico della prolattina del topo dell'Istituto nazionale per l'artrite, il metabolismo e le malattie digestive). Le ovaie, l'utero, le ghiandole surrenali e l'ipofisi sono state rimosse e pesate dai topi dei gruppi da 5 a 8. Le ghiandole mammarie inguinali sono state asportate dai topi dei gruppi da 5 a 8 e preparate per la valutazione integrale. I tumori mammari sono stati rimossi dai topi dei gruppi da 1 a 8, colorati con ematosilina ed eosina ed esaminati istologicamente. Le differenze medie tra i livelli di prolattina nel sangue, il periodo di latenza medio dell'aspetto del tumore mammario e il peso degli organi sono stati valutati statisticamente mediante il test t di Student. L'incidenza del tumore mammario è stata analizzata mediante analisi  $\chi^2$ . Per uno schema del disegno sperimentale, vedere la Tabella 1.

## RISULTATI

**Topi trattati con 2,5 mg di MNU (gruppi da I a 4).** La soppressione cronica della secrezione di prolattina o l'alimentazione con retinoidi hanno ridotto di quasi quattro quinti il numero totale di tumori mammari palpabili e ridotto della metà il numero di topi portatori di tumori mammari (Tabella 1). La soppressione combinata della prolattina e l'alimentazione con retinoidi hanno bloccato quasi completamente lo sviluppo dei tumori mammari; solo 2 topi su 30 hanno sviluppato un totale di 2 tumori mammari. Il periodo medio di latenza della comparsa del tumore mammario (giorni dopo il trattamento cancerogeno) non è stato significativamente influenzato dai trattamenti con CB-i 54 o retinoidi. Istologicamente, quasi tutti i tumori mammari palpabili erano adenocarcinomi o carcinomi papillari. I tipi istologici di tumori che si sono sviluppati durante i trattamenti erano simili a quelli che si sono sviluppati dopo il trattamento. Alla cessazione del trattamento con retinoidi più CB-i 54, i tumori mammari si sono sviluppati a un tasso paragonabile allo sviluppo del tumore nel gruppo di controllo (Grafico 1). Lo stesso fenomeno si è verificato alla cessazione dei trattamenti nei gruppi trattati con CB-i 54 (Grafico 2) e retinoidi (Grafico 3).

**Topi trattati con 1.25 mg MNU (gruppi da 5 a 8).** La soppressione cronica della prolattina o il trattamento con retinoidi hanno ridotto di circa due terzi il numero totale di tumori mammari palpabili (Tabella 1). Anche la percentuale di topi con tumori mammari è stata sostanzialmente ridotta da questi trattamenti. La soppressione della prolattina combinata con il trattamento con retinoidi hanno bloccato completamente lo sviluppo dei tumori mammari; non sono stati osservati tumori durante il periodo di trattamento di 175 giorni.

I livelli di prolattina nel sangue sono stati nettamente ridotti nei topi trattati con CB-i 54 [ $21,6 \pm 1,2$  (S.E.) ng/ml] rispetto a quelli dei topi trattati con retinoidi ( $54,1 \pm 18,4$ ) e dei controlli ( $69,0 \pm 14,9$ ). Nessuna differenza significativa è stata osservata nei livelli di prolattina nel sangue tra controllo e topi trattati con retinoidi. Peso medio ovarico (mg/100 g di peso corporeo) è stato aumentato ( $83,6 \pm 0,3$ ) e il peso ipofisario è stato ridotto ( $3,4 \pm 0,1$ ) nei topi trattati con CB-i 54 rispetto a quelli nei topi di controllo (peso ovarico,  $22,7 \pm 0,2$ ; peso ipofisario,  $7,7 \pm 0,2$ ;  $p < 0,001$ ). Il peso dell'utero e della ghiandola surrenale non è stato influenzato dal trattamento con CB-i 54. Il trattamento con retinoidi non ha influenzato in modo significativo il peso medio delle ovaie, dell'utero, dell'ipofisi o delle ghiandole surrenali. Lo sviluppo della ghiandola mammaria nei topi di controllo era caratterizzato da numerosi dotti con ramificazioni estese, molte gemme terminali e una piccola quantità di alveoli.

Nelle ghiandole mammarie dei topi trattati con retinoidi e/o CB-i 54 è stato osservato uno sviluppo leggermente inferiore di dotti, gemme terminali e alveoli. Nei topi trattati con retinoidi e/o CB-i 54 sono stati osservati meno noduli iperplastici della ghiandola mammaria rispetto ai controlli. Il trattamento con CB-i 54 non ha influenzato in modo significativo l'aumento di peso corporeo. Il trattamento con retinoidi ha ridotto il peso corporeo, rispetto ai topi di controllo e ai topi trattati con CB-i 54, dell'1 3% ( $p < 0,05$ ). I topi trattati con retinoidi consumavano circa 18 g di razione al giorno, in contrasto con i topi di controllo che consumavano circa 20 g di razione al giorno. I topi alimentati con retinoidi hanno consumato circa 6 mg di acetato di retinile ogni giorno. Le uniche apparenti anomalie indesiderabili nei topi trattati erano negli animali alimentati con retinoidi. Molti di questi animali avevano code squamose, mantelli ruvidi e fegati pallidi.

## DISCUSSIONE

È stato precedentemente riportato che l'inibizione della secrezione di prolattina indotta da CB-i 54 ha un marcato effetto inibitorio sullo sviluppo e sulla crescita della tumorigenesi mammaria indotta da idrocarburi policiclici nei topi femmina (9, 12). Sembra che questo peptide ipofisario sia importante anche nelle fasi di sviluppo della tumorigenesi mammaria indotta da MNU. Il numero di topi portatori di tumori mammari è stato ridotto del 50% e il numero totale di tumori è stato ridotto da due terzi a quattro quinti nei topi trattati con CB-i 54 poco dopo il trattamento cancerogeno. Un

ruolo importante per la prolattina nelle fasi di sviluppo di questo modello sperimentale di tumore mammario non è stato finora riportato. È importante notare, tuttavia, che l'effetto antitumorigenico del trattamento con CB-i 54 è evidente solo durante il trattamento farmacologico. Circa 2 settimane prima della cessazione del trattamento e quando il trattamento è stato interrotto, l'incidenza del tumore mammario ha iniziato ad aumentare (Grafico 2). Questo leggero aumento dell'incidenza del tumore durante le ultime 2 settimane di trattamento suggerisce un processo di selezione per i tumori mammari insensibili alla prolattina. Un precedente rapporto ha dimostrato che l'ovariectomia dei topi sia prima che subito dopo il trattamento con MNU ha anche ridotto drasticamente il numero di tumori mammari (1). Sembra quindi che il modello di tumore mammario di topo indotto da MNU sia una neoplasia ormonalmente reattiva qualitativamente simile ai modelli di topo di idrocarburi policiclici.

È stato precedentemente riportato che l'alimentazione con retinile acetato sopprime lo sviluppo di tumori mammari indotti da MNU nei topi (3). I nostri risultati confermano questo studio. Inoltre, abbiamo dimostrato che dopo la cessazione dell'alimentazione con retinil acetato, il tasso di incidenza del tumore mammario è paragonabile a quello osservato nei controlli (Grafico 3). Pertanto, le attività antitumorigeniche del retinil acetato erano evidenti solo quando gli animali venivano nutriti con il retinoide. Non erano evidenti effetti antitumorali duraturi dopo la cessazione del trattamento con retinoidi. Va sottolineato che durante le ultime 2 settimane di trattamento con retinoidi è stato anche notato un aumento sostanziale dell'incidenza del tumore. Ancora una volta, come nei topi trattati con CB-i 54, sembra che si stia verificando una selezione per tumori insensibili.

Sebbene il trattamento cronico con CB-i 54 o l'alimentazione con retinoidi da soli fosse efficace nel ridurre notevolmente l'incidenza del tumore mammario, la modalità combinata era superiore a entrambi i trattamenti da soli.

Il trattamento combinato ha bloccato completamente la formazione del tumore mammario nei topi trattati con la bassa dose di MNU (i .25 mg) e solo 2 tumori mammari si sono sviluppati in 30 topi trattati con la dose più alta (2,5 mg) del cancerogeno. A nostra conoscenza, nessuno ha mai tentato di migliorare l'efficacia antitumorigena dell'alimentazione con retinoidi mediante terapia endocrina concomitante. È chiaro dai risultati del nostro studio che si verifica un sinergismo tra questi 2 tipi nettamente diversi di modalità terapeutiche nel modello di tumore mammario di topo indotto da MNU. È anche evidente che l'effetto antitumorigenico della modalità combinata è efficace solo durante i trattamenti; alla cessazione dei trattamenti, il tasso di sviluppo del tumore mammario è paragonabile a quello dei topi di controllo alimentati con placebo (Grafico i).

Quando si confronta l'alimentazione con retinil acetato con la soppressione cronica della prolattina indotta da CB i 54 sul benessere generale dell'animale, è chiaro che il trattamento con l'ergot è notevolmente superiore al trattamento con retinoidi. CB-i 54 è un efficace inibitore specifico della secrezione di prolattina; non interferisce in modo significativo con altri processi endocrini ai livelli di dose utilizzati in questo studio(6, 10). I topi trattati con l'ergot assomigliavano sotto ogni aspetto ai topi di controllo; l'unica grande disparità è stata osservata nella ghiandola mammaria, cioè c'era una cospicua riduzione o assenza di neoplasia negli animali con soppressione della prolattina. [I topi con soppressione della prolattina hanno ovaie ingrossate ma cicli estrali normali (11) a causa della diminuzione della luteolisi della prolattina]. Al contrario, gli animali alimentati con acetato di retinile avevano una lieve ma significativa riduzione dell'aumento di peso corporeo e una condizione generale di insalubrità caratterizzata da lieve pelo ruvido, coda squamosa e fegato pallido. Si ritiene che i ridotti aumenti di peso corporeo osservati nei topi trattati con retinoidi (<3%) siano di entità insufficiente per ostacolare in modo significativo la carcinogenesi mammaria. Poiché l'inizio del trattamento con retinoidi si è verificato 3 giorni dopo il trattamento con cancerogeno, è molto improbabile che i retinoidi abbiano influenzato il catabolismo epatico del cancerogeno.

Tuttavia, il grado in cui la lieve insalubrità indotta dai retinoidi ha influenzato il processo cancerogeno in questo studio non può essere risolto in questo momento. Un maggiore successo nello sviluppo di analoghi sintetici dei retinoidi che siano meno nocivi dell'acetato di retinile ma possiedano qualità antitumorigeniche comparabili è essenziale se si vuole che gli analoghi della vitamina A abbiano un'applicazione pratica significativa. Una volta che questi analoghi saranno sviluppati e si noteranno progressi in questo settore (5), le terapie combinate endocrine e retinoidi nella profilassi della carcinogenesi mammaria nell'uomo potrebbero essere una realtà.