

Titolo: “Inibizione da parte dell'acido retinoico della collagenolisi di tipo IV e dell'invasione attraverso una membrana basale ricostituita di cellule metastatiche di adenocarcinoma mammario di ratto - Inhibition by Retinoic Acid of Type IV Collagenolysis and Invasion through Reconstituted Basement Membrane by Metastatic Rat Mammary Adenocarcinoma Cells.”

Codice: RET009

Autore: Nakajima et al.

Data: 1989

Rivista: Cancer Research 49 (7): 1698–1706.

Argomento: Retinoidi

Accesso libero: si

DOI: PMID: 2538232

URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/49/7/1698/494906/Inhibition-by-Retinoic-Acid-of-Type-IV>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/04/15/ret009-nakajima-et-al-1989/>

Parole chiave: retinoidi, acido retinoico tutto trans, metastasi, invasione, collagenasi, matrice extra cellulare, attività differenziante

Tumore: adenocarcinoma mammario

Traduzione: tradotte interamente e in modo fedele (solo minime semplificazioni) le sezioni “Riassunto”, “Introduzione” e “Discussione”. Presentato in modo sintetico la sezione “Materiali e Metodi”

**Punti di interesse:** La formazione di metastasi, il processo mediante il quale le cellule tumorali si diffondono dal tumore primario attraverso la circolazione agli organi distanti, è un fenomeno complesso che richiede molti passaggi sequenziali. Una delle fasi iniziali è l'invasione delle cellule tumorali primarie nei tessuti circostanti dell'ospite e nei vasi sanguigni o nei canali linfatici. Attraverso la circolazione, le cellule tumorali vengono disseminate in vari organi. Una proprietà delle cellule tumorali, prerequisito per la formazione di metastasi, è la capacità di degradare la matrice extracellulare del tessuto connettivo e i componenti della membrana basale, che costituiscono barriere per l'invasione delle cellule tumorali. La membrana basale è una struttura laminare specializzata della matrice extracellulare; di solito fa da interfaccia tra un tessuto connettivale e un tessuto non connettivale, tipicamente epiteliali. È stato dimostrato che le cellule tumorali metastatiche producono enzimi che sono in grado di degradare i vari componenti della matrice extracellulare e la membrana basale. Uno degli enzimi proteolitici coinvolti è la collagenasi di tipo IV, che mostra la capacità di degradare il collagene di tipo IV, la principale proteina strutturale costituente delle membrane basali subendoteliali. Questo enzima svolge un ruolo importante nell'invasione e i suoi livelli sono correlati al potenziale metastatico di varie cellule trasformate e maligne. Le collagenasi sono enzimi del gruppo delle metalloproteasi in grado di degradare le principali proteine che costituiscono il tessuto connettivo. Le collagenasi tagliano i legami peptidici presenti nel collagene.

I retinoidi possono sopprimere il fenotipo trasformato e migliorare la differenziazione di molti tipi di cellule tumorali in coltura e in vivo. Diversi retinoidi diminuiscono l'attività della collagenasi di tipo I in varie cellule normali non tumorali. Solo studi limitati hanno esaminato gli effetti dei retinoidi sulle collagenasi delle cellule tumorali.

Il presente studio è stato intrapreso per determinare se i retinoidi influenzano l'attività collagenolitica di tipo IV e l'invasività delle cellule metastatiche. È stato usato un clone cellulare di adenocarcinoma mammario di ratto, contraddistinto dalla sigla MTF7.T35.3. È stato dimostrato che queste cellule producono attività collagenolitica di tipo IV ed è stata stabilita un'eccellente correlazione tra questa attività e il potenziale metastatico delle cellule in vivo. Sono stati testati diversi tipi di retinoidi ed effettuati saggi per la degradazione della matrice subendoteliale, la collagenolisi di tipo IV, studi per l'identificazione degli enzimi collagenolitici secreti e saggi di invasione cellulare tramite l'utilizzo di una membrana basale ricostruita.

I risultati di questo studio hanno dimostrato la capacità dell'acido retinoico e di altri retinoidi sintetici di inibire la produzione dell'attività collagenolitica di tipo IV delle cellule di adenocarcinoma mammario metastatico. È stato dimostrato che l'acido retinoico ha modulato le metalloproteinasi collagenolitiche di tipo IV e in più dettaglio:

- (a) le cellule trattate con acido retinoico hanno mostrato una ridotta capacità di degradare la matrice extracellulare;
- (b) le cellule trattate con acido retinoico o con altri retinoidi possedevano una ridotta capacità di degradare il collagene di tipo IV;
- (c) i livelli di enzimi collagenolitici rilevati nei mezzi colturali erano inferiori per cellule trattate con retinoidi rispetto ai controlli non trattati.

L'inibizione della produzione di collagenasi da parte delle cellule di adenocarcinoma mammario di ratto si è verificata indipendentemente dalla modulazione della crescita nella coltura monostrato. La crescita di queste cellule non è stata inibita dall'acido retinoico all-trans, se non quando le cellule erano trattate con 10  $\mu$ M di acido tutto-trans retinoico. L'inibizione della produzione di collagenasi invece era evidenza anche a concentrazioni minori di acido retinoico. Questi risultati suggeriscono che la soppressione dell'attività collagenolitica di tipo IV da parte di acido tutto-trans retinoico può essere una conseguenza della soppressione del fenotipo trasformato, poiché diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra la trasformazione e la produzione di collagenasi di tipo IV (attività differenziante dell'acido retinoico).

Il presente studio è stato dimostrato che il trattamento con acido retinoico all-trans di cellule di carcinoma mammario di ratto sopprime la loro capacità di invadere e passare attraverso una membrana basale. Tuttavia, i livelli di inibizione dell'invasione da parte dell'acido retinoico sembravano essere superiori a quelli dell'inibizione della collagenolisi di tipo IV, suggerendo che l'inibizione dell'invasione può anche dipendere dagli effetti dell'acido retinoico su altre attività cellulari, ad esempio, la motilità cellulare.

I ricercatori concludono l'articolo affermando che "se l'inibizione da parte dei retinoidi della degradazione e dell'invasione della membrana basale osservata nel presente studio in vitro può essere ottenuta anche in vivo, allora i retinoidi potrebbero sopprimere l'invasione e la metastasi di alcune cellule tumorali."

## **Traduzione articolo**

### **Riassunto**

**L'attività della collagenasi di tipo IV, che consente alle cellule tumorali di degradare il collagene di tipo IV presente nella membrana basale subendoteliale, è stata correlata con il potenziale metastatico in diversi tipi di tumore, tra cui la linea cellulare di adenocarcinoma**

**mammario di ratto 13762NF e i suoi cloni. In questo studio, abbiamo esaminato se l'acido tutto trans-retinoico (all-trans-RA) e altri retinoidi, che esibiscono attività antitumorale in vitro e in vivo, influenzano l'attività collagenolitica delle cellule di adenocarcinoma mammario di ratto metastatico 13762NF. Le cellule del clone altamente metastatico a livello polmonare MTF7.T35.3, derivato dalla linea cellulare 13762NF, sono state trattate per 3 giorni con 0,1, 1 o 10 µm all-trans-RA, raccolte e seminate su matrice extracellulare marcata con [<sup>3</sup>H] prolina e depositata da cellule endoteliali di polmone di ratto in coltura o su un film di collagene di tipo IV purificato marcato con [<sup>3</sup>H] prolina. È stata misurata la quantità di radioattività rilasciata nel mezzo durante le successive 24-72 ore e si è riscontrato che il trattamento all-trans-RA ha inibito la degradazione della matrice extracellulare e del collagene di tipo IV dal 50 al 60%. Questo effetto è stato osservato se le cellule erano state trattate con all-trans-RA in mezzo privo di siero o in mezzo integrato con siero bovino fetale inattivato al calore o trattato con acido. La crescita delle cellule non è stata inibita in queste condizioni, tranne dopo il trattamento con 10 µm di all-trans-RA in terreno privo di siero. La riduzione dell'attività collagenolitica è stata osservata nelle cellule vitali così come nel terreno condizionato. Un'esposizione di 24 ore delle cellule a all-trans-RA è stata sufficiente a causare una diminuzione del 30% dell'attività collagenolitica e questo effetto inibitorio era reversibile. L'aggiunta diretta di all-trans-RA al mezzo condizionato non ha avuto alcun effetto sull'attività della collagenasi secreta. I pesi molecolari apparenti degli enzimi collagenolitici sono stati determinati mediante elettroforesi di estratti cellulari e terreno condizionato concentrato in gel di poliacrilammide incorporati nel collagene di tipo IV, seguiti da rinaturazione e attivazione degli enzimi all'interno dei gel. Con questo metodo sono state rilevate due principali metalloproteinasi collagenolitiche di tipo IV con pesi molecolari rispettivamente di 64.000 e 88.000. Si è scoperto che questi due enzimi hanno anche specificità per il gel. L'enzima con peso molecolare 64.000 è stato estratto da cellule vitali (presumibilmente dalla membrana cellulare) con il 2% di 1-butanolo. Il trattamento con all-trans-RA ha ridotto il livello di questi enzimi nei compartimenti cellulari, della membrana cellulare e del mezzo condizionato. Altri retinoidi, tra cui 13-cis-RA, retinolo, sopprimevano anche il livello degli enzimi collagenolitici secreti di tipo IV. Il trattamento continuo delle cellule di adenocarcinoma con 1 o 10 µm di all-trans-RA ha inibito la loro capacità di invadere attraverso una membrana basale ricostituita (filtri rivestiti con Matrigel). Questi risultati dimostrano la capacità dei retinoidi di sopprimere la produzione di metalloproteinasi collagenolitiche di tipo IV nelle cellule di adenocarcinoma mammario e di inibire la loro invasività in vitro. Tale effetto in vivo può diminuire l'invasività dei tumori maligni.**

## INTRODUZIONE

La metastasi, il processo mediante il quale le cellule tumorali si diffondono dal tumore primario attraverso la circolazione agli organi distanti, è un fenomeno complesso che richiede molti passaggi sequenziali. Una delle fasi iniziali è l'invasione delle cellule tumorali primarie nei tessuti circostanti dell'ospite e nei vasi sanguigni o nei canali linfatici (intravasazione). Attraverso la circolazione, le cellule tumorali vengono disseminate in vari organi, dove aderiscono in modo specifico o vengono arrestate in modo aspecifico nei letti capillari. I passaggi successivi includono lo stravasamento per invasione attraverso le cellule endoteliali capillari e la matrice extra cellulare (ECM) subendoteliale nei tessuti e la proliferazione delle cellule per formare tumori secondari. Il completamento con successo della cascata di eventi che culmina nella formazione di metastasi dipende dall'espressione di proprietà uniche da parte delle cellule tumorali progenitrici, nonché dalle interazioni cellula tumorale-ospite (per le revisioni, vedere Rif. 1-4).

Una proprietà delle cellule tumorali che è un prerequisito per la metastasi è la capacità di degradare la matrice extracellulare del tessuto connettivo e i componenti della membrana basale, che

costituiscono barriere per l'invasione delle cellule tumorali. Infatti, è stato dimostrato che le cellule tumorali metastatiche producono enzimi come proteasi e glicosidasi che sono in grado di degradare i vari componenti della matrice extracellulare (4-16).

Si presume che uno degli enzimi proteolitici, la collagenasi di tipo IV, che mostra la capacità di degradare il collagene di tipo IV, la principale proteina strutturale costituente delle membrane basali subendoteliali, svolga un ruolo importante nell'invasione poiché i suoi livelli sono correlati al potenziale metastatico di vari cellule trasformate e maligne (4,6,11-15), inclusi cloni di adenocarcinoma mammario di ratto derivati dalla linea cellulare 13762NF (16).

I retinoidi, un gruppo di metaboliti della vitamina A e analoghi sintetici, possono sopprimere il fenotipo trasformato e migliorare la differenziazione di molti tipi di cellule tumorali in coltura e in vivo (per le revisioni, vedere Rif. 17-19). Alcuni di questi composti sono in fase di valutazione per il potenziale utilizzo nella prevenzione e nel trattamento del cancro negli esseri umani (20). Diversi retinoidi diminuiscono l'attività della collagenasi di tipo I in varie cellule non trasformate e normali, comprese le cellule sinoviali di pazienti con artrite reumatoide in cui l'elevata attività della collagenasi è accompagnata dall'invasione delle cellule sinoviali non maligne nella cartilagine articolare ma anche altri tipi cellulari (21 - 27). Solo studi limitati hanno esaminato gli effetti dei retinoidi sulle collagenasi delle cellule tumorali. L'induzione da parte dell'acido retinoico della differenziazione delle cellule di carcinoma embrionale murino in cellule endodermiche è stata accompagnata da un'augmentata produzione di una collagenasi di tipo IV sia latente che attiva (28), mentre il trattamento delle cellule di melanoma umano con diversi retinoidi non ha avuto alcun effetto su questo enzima (29).

Il presente studio è stato intrapreso per determinare se i retinoidi influenzano l'attività collagenolitica di tipo IV e l'invasività delle cellule metastatiche. Il clone MTF7.T35.3, derivato dalla linea cellulare di adenocarcinoma mammario di ratto 13762NF, è stato scelto per questa indagine perché è stato dimostrato che le cellule derivate da 13762NF producono attività collagenolitica di tipo IV e perché è stata stabilita un'eccellente correlazione tra questa attività e il potenziale metastatico delle cellule in vivo (16). I risultati preliminari di questo studio sono stati precedentemente riportati in un riassunto (30).

## MATERIALI E METODI

Colture cellulari usate: è stato selezionato il clone di cellule di adenocarcinoma mammario di ratto MTF7.T35.3 mediante clonazione in vitro da cellule MTF7 derivate da un tumore di adenocarcinoma mammario 13762NF.

Retinoidi testati: all-trans-RA, 13-cis-RA, TTNPB, TTNP e CH55, retinolo, retinale, analogo retinico, fenile dell'acido retinoico e l'analogo TMMP dell'acido retinoico. I retinoidi sono stati sciolti in dimetil sulfoxide, conservati e aggiunti immediatamente al mezzo di crescita prima di ogni esperimento.

Sono state effettuati test per: degradazione della matrice subendoteliale, la collagenolisi di tipi IV, identificazione degli enzimi collagenolitici di tipo IV secreti, saggi di invasione.

## DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato la capacità dell'acido retinoico e di alcuni altri retinoidi di inibire la produzione dell'attività collagenolitica di tipo IV da parte delle cellule di adenocarcinoma mammario metastatico. Approcci differenti, ma complementari, hanno dimostrato che l'acido retinoico ha modulato le metalloproteinasi collagenolitiche di tipo IV: (a) le cellule trattate con acido retinoico hanno mostrato una ridotta capacità di rilasciare [<sup>3</sup>H] prolina dalla matrice extracellulare marcata metabolicamente prodotta e depositata da cellule endoteliali polmonari di ratto; (b) le cellule trattate con acido retinoico o con altri retinoidi possedevano una ridotta capacità di degradare il collagene di tipo IV marcato con [<sup>3</sup>H]-prolina purificato dal tessuto tumorale del

sarcoma di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), così come i mezzi condizionati da queste cellule; e (c) i livelli di enzimi collagenolitici rilevati nei gel di poliacrilammide contenenti collagene di tipo IV erano inferiori nelle cellule trattate con retinoidi e nei terreni condizionati rispetto ai controlli non trattati. Diversi enzimi collagenolitici sono stati rilevati mediante analisi su gel di substrato degli estratti di carcinoma mammario di ratto preparati da cellule non trattate; la maggior parte di questi enzimi esibivano pesi molecolari di 64.000 e 88.000. Sono state osservate anche molecole con pesi molecolari di 70.000 e 80.000. La metalloproteinasi con peso molecolare di 64.000 poteva essere estratta dalla membrana cellulare con 1-butanol, e il mezzo condizionato conteneva principalmente gli enzimi con massa molecolare 64.000 e 88.000. Le metalloproteinasi collagenolitiche, come le collagenasi, le gelatinasi e le stromelisine, prodotte da altri tipi di cellule normali e tumorali, avevano pesi molecolari compresi tra 25.000 e 95.000 (40-53). È stato dimostrato che la collagenasi di tipo IV purificata da un sarcoma murino metastatico appare come due bande di pesi molecolari di 62.000 e 68.000 dopo l'attivazione della tripsina (44). Anche le collagenasi umane di tipo IV con pesi molecolari da 66.000 a 67.000 sono state purificate da monociti/macrofagi (47) e cellule epiteliali bronchiali trasformate dall'oncogene H-ras (48). Questi enzimi sono secreti in forma latente, ma possono esistere anche sulla superficie cellulare (4, 50).

Abbiamo precedentemente scoperto che le metalloproteinasi secrete dalle cellule di adenocarcinoma mammario di ratto degradano entrambe le subunità  $\alpha$  del procollagene di tipo IV e producono caratteristici frammenti di grandi dimensioni (16). In questo studio, come substrati sono stati utilizzati procollagene di tipo IV dal sarcoma di EHS, collagene di tipo IV trattato con pepsina dalla capsula anteriore del cristallino bovino, gelatina e altre proteine. Solo i collagene di tipo IV e la gelatina incorporati nei gel di poliacrilammide erano sensibili alle due principali metalloproteinasi (pesi molecolari 88.000 e 64.000) rilasciate dalle cellule MTF7.T35.3. Pertanto, questi enzimi hanno una specificità ristretta rispetto alla gelatina e ai collagene di tipo IV. Recentemente, Ballin et al. (51) hanno riferito che l'oncogene ras mediava l'induzione di una metalloproteinasi con un peso molecolare di circa 92.000 in grado di degradare la gelatina e il collagene di tipo IV, e Yamagata et al. (52) e Morikawa et al. (53) hanno dimostrato la forte associazione dell'espressione enzimatica di pesi molecolari da ~ 92.000 a 95.000 con il potenziale metastatico delle cellule di carcinoma del colon murino e umano. Questi enzimi ad alto peso molecolare sono stati rilevati su zimogrammi senza attivazione della tripsina e le loro caratteristiche sono molto simili a quelle dell'adenocarcinoma mammario di ratto collagenasi di tipo IV peso molecolare 88.000.

Il trattamento con acido retinoico delle cellule di carcinoma mammario MTF7.T35.3 di ratto ha comportato una diminuzione della quantità di entrambe le metalloproteinasi collagenolitiche, (peso molecolare 64.000 e 88.000) nei pool di enzimi cellulari e secreti. Allo stesso modo, la quantità dell'enzima con peso molecolare 64.000 estraibile dalle cellule con 1-butanol era diminuita nelle cellule trattate con tutto-trans acido retinoico. La diminuzione dell'attività della collagenasi nelle cellule dell'adenocarcinoma mammario non rifletteva una riduzione generale e non specifica della sintesi proteica, come mostrato in Fig. 4.

La maggior parte degli effetti precedentemente riportati dei retinoidi sulle attività di vari enzimi nelle cellule tumorali, tra cui ornitina decarbossilasi, attivatore del plasminogeno, transglutaminasi, protein chinasi (18) e glicosiltransferasi (54), erano accompagnati dalla modulazione della proliferazione e differenziazione cellulare. Al contrario, l'inibizione della produzione di collagenasi da parte delle cellule di adenocarcinoma mammario di ratto nel presente studio si è verificata indipendentemente dalla modulazione della crescita nella coltura monostrato, poiché la crescita di queste cellule non è stata inibita da all-trans-acido retinoico, se non quando le cellule erano trattate con 10  $\mu$ M di acido tutto-trans retinoico. I risultati preliminari indicano che 1  $\mu$ M di all-trans acido retinoico, può sopprimere dall'80 al 90% la capacità delle cellule MTF7.T35.3 di formare colonie in agarosio allo 0,5% senza riduzione della vitalità (dati non mostrati). Pertanto, il fenotipo trasformato di queste cellule può essere preferenzialmente soppresso da acido retinoico tutto-trans.

Poiché diversi studi hanno dimostrato una correlazione tra la trasformazione e la produzione di collagenasi di tipo IV (14, 48), i nostri risultati suggeriscono che la soppressione dell'attività collagenolitica di tipo IV da parte di acido tutto-trans retinoico può essere una conseguenza della soppressione del fenotipo trasformato.

Il meccanismo mediante il quale i retinoidi diminuiscono l'attività collagenolitica del collagene di tipo IV nelle cellule tumorali mammarie non è noto. È stato dimostrato che i retinoidi modulano l'espressione di vari geni in vivo e in colture di cellule normali e maligne (17-19); pertanto, proponiamo che i retinoidi sopprimano l'espressione dei geni dell'enzima collagenolitico. Questa affermazione è supportata da prove indirette e dirette. Il trattamento dei campioni con agenti che attivano le metalloproteinasi non ha influenzato in modo significativo i risultati dei nostri esperimenti (dati non mostrati). Pertanto, è probabile che i livelli ridotti di attività dell'enzima collagenolitico di tipo IV intracellulare ed extracellulare siano dovuti all'inibizione della produzione dell'enzima.

La secrezione di collagenasi capaci di degradare i collagene interstiziali (tipi da I a III) è stata correlata al fenotipo metastatico dei tumori mammarie murini (58). Tali collagenasi sono state trovate anche nella membrana plasmatica delle cellule tumorali umane ed è stato proposto che gli enzimi di superficie possano svolgere un ruolo importante nell'invasione tanto quanto le collagenasi secrete (50). Il retinilpalmitato somministrato nella dieta di topi inoculati s.c. con cellule di adenocarcinoma mammario sopprimevano la crescita tumorale e le metastasi e diminuivano del 50% il livello di collagenasi di tipo I associata al tumore (46). È stato suggerito che la vitamina A potrebbe essere utilizzata per inibire le metastasi attraverso la soppressione della collagenasi, determinando l'intrappolamento dei tumori all'interno di una capsula di collagene (46). Tuttavia, questo studio non ha potuto determinare se la collagenasi associata al tumore fosse derivata dalle stesse cellule tumorali o da cellule ospiti infiltranti.

Gli inibitori della sintesi proteica e gli inibitori delle metalloproteinasi bloccano l'invasione della matrice extracellulare da parte delle cellule tumorali (57, 59, 60).

È stato dimostrato che i retinoidi inibiscono l'invasione della membrana corioallantoidea dell'embrione di pollo da parte di cellule di ratto trasformate viralmente a dosi inferiori a quelle richieste per l'inibizione della crescita. Questo effetto è stato attribuito alla capacità dei retinoidi di migliorare la differenziazione del corioallantoide (61).

Tuttavia, una diminuzione dell'attività collagenolitica di tipo IV potrebbe anche portare a una diminuzione dell'invasione. Il fatto che la collagenasi di tipo IV svolga un ruolo nell'invasione del tumore in vivo è stato indicato dalla localizzazione immunostochimica dell'enzima vicino alle cellule invasive del carcinoma mammario e alle metastasi linfonodali del carcinoma mammario (62).

Nel presente studio, abbiamo dimostrato che il trattamento con acido retinoico all-trans di cellule di carcinoma mammario di ratto sopprime la loro capacità di invadere e passare attraverso una membrana basale, come ci si aspetterebbe in vista dell'inibizione della collagenolisi della matrice extracellulare. Tuttavia, i livelli di inibizione dell'invasione da parte dell'acido retinoico sembravano essere superiori a quelli dell'inibizione della collagenolisi di tipo IV, suggerendo che l'inibizione dell'invasione può anche dipendere dagli effetti dell'acido retinoico su varie attività cellulari diverse dalla produzione di collagenasi di tipo IV (ad esempio, la motilità cellulare).

Precedenti studi hanno dimostrato la capacità dei retinoidi di inibire la crescita di cellule tumorali mammarie murine e umane in coltura (63-66) e in topi nudi (66, 67). I retinoidi sopprimono anche le metastasi del carcinoma mammario umano trapiantato in topi nudi (67). Sebbene questo studio presenti risultati con un solo clone di adenocarcinoma mammario di ratto, i nostri recenti studi hanno dimostrato una simile inibizione dell'invasione e della collagenolisi da parte dell'acido retinoico in diverse linee cellulari di melanoma murino e umano. Se l'inibizione da parte dei

retinoidi della degradazione e dell'invasione della membrana basale osservata nel presente studio in vitro può essere ottenuta anche in vivo, allora i retinoidi potrebbero sopprimere l'invasione e la metastasi di alcune cellule tumorali.