

Titolo: “Azioni sinergiche di Alpelisib e Melatonina nelle linee cellulari di carcinoma mammario con mutazione del gene PIK3CA - Synergistic actions of Alpelisib and Melatonin in breast cancer cell lines with *PIK3CA* gene mutation”

Codice: MLT011

Autore: de Godoy et al.

Data: 2023

Rivista: Life Science 324, 121708

Argomento: melatonina

Accesso libero: si (preprints)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121708>

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320523003429>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/07/04/mlt-011-de-godoy-et-al-2023/>

Parole chiave: cancro al seno; Alpelisib; Melatonina; PIK3CA; MDA-MB-453; T-47D

Tumore: carcinoma mammario

Traduzione: tradotte le sezioni “Riassunto”, “Introduzione” e “Discussione” in modo totale e fedele. Tradotte in modo sintetico e per punti le sezioni “Materiali e Metodi” e “Risultati”.

Punti di interesse: In questo studio è stata valutata la possibile sinergia tra la melatonina e il farmaco Alpelisib (BYL719) inibitore specifico di un enzima, indicato con la sigla PI3K α . Il PI3K è un enzima implicato nelle vie di segnalazioni e agisce fosforilando dei componenti della membrana cellulare, attivandoli, attivando così il trasporto cellulare attraverso la membrana cellulare. La via di segnalazione che coinvolge questo enzima (PI3K) è indicata con gli acronimi PI3K/AKT/mTOR, che sono tre abbreviazioni per indicare tre enzimi coinvolti in una sequenza di reazioni biochimiche che svolge un ruolo importante nel regolare la proliferazione cellulare, la migrazione cellulare, il metabolismo, l'angiogenesi e l'apoptosi. Nel carcinoma mammario, la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR può essere deregolamentata da diversi meccanismi, tra cui una mutazione nel gene PIK3CA. Questa mutazione porta ad un aumento dell'attività dell'enzima PI3K e di conseguenza, promuove l'attivazione del segnale a valle portando a crescita deregolata, proliferazione e aumento della sopravvivenza cellulare.

Le motivazioni dello studio (e quindi della valutazione di una potenziale sinergia tra melatonina e Alpelisib) si basano sul fatto che con questo farmaco sono state osservate risposte parziali e stabilizzazione nei carcinomi mammari con mutazione in PIK3CA, ma non una regressione sostanziale. Quindi secondo gli autori il potenziamento delle azioni oncostatiche di questo farmaco sarebbe auspicabile. Hanno pensato di valutare una potenziale sinergia con la melatonina perché, sia il farmaco studiato sia la melatonina alterano l'espressione proteica dei bersagli della via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR.

Per questo studio sono state usate tre linee cellulari di carcinoma mammario: la linea MDA-MB-468 (triplo negativo), la linea cellulare MDA-MB-453 triplo negativo con mutazione PIK3CA, 3) la linea cellulare T-47D con mutazione PIK3CA. Le colture sono state divise in quattro gruppi di trattamento: 1) controllo; 2) melatonina; 3) alpelisib; e 4) alpelisib + melatonina. Il trattamento con

i principi attivi è stato fatto per 24h. Dopo di che in queste colture sono state studiate: la vitalità cellulare, la capacità di migrazione cellulare, l'espressione proteica delle proteine PI3K, AKT, mTOR, coinvolte nella via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR. Inoltre è stata studiata anche la sintesi proteica del fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 α e della caspasi-3.

Lo studio ha dimostrato che la melatonina è in grado di diminuire la vitalità cellulare e la migrazione cellulare delle cellule delle colture studiate, e anche la sintesi proteica dei singoli enzimi coinvolti nella via di segnalazione studiata, del fattore inducibile dall'ipossia e della caspasi-3. Hanno dimostrato anche una sinergia tra il farmaco e la melatonina, anche se non sempre. Nelle colture cellulari di triplo negativo senza mutazione, la sola melatonina dopo 24h di trattamento ha determinato una riduzione del 55% dell'invasione e migrazione delle cellule.

Gli autori concludono che "in generale" è stato osservato il potenziamento dell'effetto di Alpelisib da parte della melatonina, in particolare nel TNBC portatore della mutazione H1047R in PIK3CA (MDA-MB-453). In questo caso (quindi nella linea cellulare MDA-MB-453), la terapia combinata ha aumentato le riduzioni della vitalità cellulare e della migrazione rispetto a quelle causate da entrambi i trattamenti da soli. Inoltre la combinazione dei due principi attivi ha ridotto l'espressione proteica degli enzimi studiati, del fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 α , e aumentando l'espressione della caspasi.

Concludendo l'articolo, gli autori affermano anche che oltre ad avere azioni sinergiche con Alpelisib, la melatonina riduce comunemente la tossicità collaterale delle chemioterapie e migliora il benessere del paziente.

Glossario

PI3K (o PIK3): enzima fosfatidilinositolo 3-chinasi, implicato in una via di trasduzione dei segnali chimici attraverso la membrana cellulare (via di segnalazione PI3K). La PI3K agisce fosforilando un fosfolipide della membrana cellulare, che così fosforilato attiva il reclutamento di proteine che consentono il trasporto attraverso la membrana. Questo enzima è costituito da 2 subunità codificate da due diversi geni. Il gene PIK3CA codifica per la subunità p110 α (p110 α) dell'enzima PI3K.

AKT o protein-chinasi B: è una proteina citosolica (si trova all'interno della cellula). È un enzima e la sua attività consiste nella fosforilazione di vari substrati proteici. L'attivazione di AKT provoca come risultato effettivo l'attivazione di vie biochimiche che portano alla crescita cellulare ed alla resistenza all'apoptosi.

mTOR: altro enzima protein-chinasi che fosforila (cede un gruppo fosfato) amminoacidi di proteine regolandone l'attività. Regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi proteica e la trascrizione.

Fattore inducibile dall'ipossia (HIF-1 α) è un fattore di trascrizione che risponde alla diminuzione dell'ossigeno disponibile nell'ambiente cellulare. Lo stato di bassa concentrazione di ossigeno attraverso l'attivazione di HIF favorisce tutta una serie di azioni, come la formazione di nuovi vasi sanguigni che consentono a cellule e tessuti di superare lo stato di ipossia.

Caspasi 3 (CASP-3): La proteina CASP3 è un membro della famiglia delle proteasi dell'acido cisteina-aspartico (caspasi). L'attivazione delle caspasi gioca un ruolo centrale nella fase di esecuzione dell'apoptosi cellulare.

Traduzione articolo

Riassunto

Obiettivi: Il carcinoma della mammella (BC) presenta un alto tasso di mortalità e circa il 30-40% presenta una mutazione nel gene PIK3CA. Alpelisib è un inibitore PI3K che agisce su p110 α . La melatonina ha mostrato importanti effetti antineoplastici e può aumentare l'efficacia della chemioterapia. Questo studio ha valutato l'azione sinergica di Alpelisib e Melatonina nelle linee BC portatrici della mutazione H1047R in PIK3CA, relativamente alla dinamica cellulare e alla via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR.

Metodi principali: le cellule MDA-MB-468 (triplo negativo), MDA-MB-453 (triplo negativo, H1047R PIK3CA) e T-47D (luminale A, H1047R PIK3CA) sono state divise in quattro gruppi di trattamento: controllo; Melatonina (1 mM); Alpelisib (1 micron); e Alpelisib (1 μ M) + Melatonina (1 mM). La vitalità cellulare e la migrazione sono state studiate utilizzando rispettivamente il saggio MTT e il saggio Transwell. L'espressione proteica di PI3K, p-AKT, mTOR, HIF-1 α e caspasi-3 è stata verificata mediante immunocitochimica.

Principali risultati: il test MTT ha rivelato che MDA-MB-453 e T-47D hanno mostrato una riduzione della vitalità cellulare in tutti i gruppi, in particolare nel MDA-MB-453 trattato con Melatonina + Alpelisib. MDA-MB-468 presenta riduzione della migrazione cellulare solo con Melatonina, mentre nelle linee con mutazione, il trattamento con Melatonina + Alpelisib ha causato l'inibizione della migrazione cellulare. PI3K, p-AKT, mTOR e HIF-1 α sono stati inibiti dopo il trattamento con melatonina + Alpelisib nelle linee MDA-MB-453 e T-47D. L'espressione della caspasi-3 è aumentata in tutti i gruppi nelle cellule MDA-MB-453 e T-47D, essendo l'aumento più pronunciato nel gruppo Melatonina + Alpelisib.

Significato: questi risultati indicano che l'uso combinato di Melatonina e Alpelisib può essere più efficace nell'inibire il BC nelle donne portatrici della mutazione del gene PIK3CA rispetto a entrambi i trattamenti da soli.

1. Introduzione

Il cancro al seno (BC) è la neoplasia più comune negli esseri umani in tutto il mondo [1], [2]. Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è altamente eterogeneo, biologicamente più aggressivo e si evolve rapidamente con recidiva e coinvolgimento dei linfonodi e metastasi a distanza [3], [4]. I pazienti con diagnosi di TNBC hanno un tasso di mortalità più elevato entro cinque anni dalla diagnosi rispetto ad altri sottotipi di BC [5].

La via di segnalazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K)/proteina chinasi B (AKT)/target della rapamicina dei mammiferi (mTOR) svolge un ruolo importante nella crescita non regolata, nella proliferazione, nella migrazione cellulare, nel metabolismo, nell'angiogenesi e nell'apoptosi. Nel carcinoma mammario, la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR può essere deregolamentata da diversi meccanismi [6]. La subunità catalitica dell'oncogene fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato 3-chinasi alfa (PIK3CA) codifica la subunità p110 α della proteina PI3K [7].

Le mutazioni nel gene PIK3CA sono presenti nel 25-46% delle neoplasie mammarie e sono associate a chemioresistenza, prognosi riservata e minore sopravvivenza globale delle pazienti [5]. Circa il 16% dei TNBC presenta mutazioni in PIK3CA [8] e la stragrande maggioranza delle mutazioni attivate da PIK3CA si verifica in p110 α , essendo più presente nei tumori metastatici [9], [10]. La mutazione H1047R (3140A>G) nel il gene PIK3CA porta ad un aumento della funzione dell'isoforma catalitica p110 α , con conseguente iperattivazione della via PI3K [7], [11]. Di conseguenza, ciò induce un aumento dell'AKT fosforilato (p-AKT), che promuove l'attivazione del segnale a valle portando a crescita deregolata, proliferazione e aumento della sopravvivenza cellulare [7].

A valle della via PI3K/AKT/mTOR ci sono alcune proteine che influenzano la progressione del cancro al seno, come il fattore inducibile dall'ipossia (HIF-1 α). Questa proteina svolge un ruolo fondamentale nell'adattamento delle cellule tumorali all'ipossia, attivando la trascrizione di geni bersaglio che regolano l'angiogenesi [12].

D'altra parte, l'attività della caspasi-3 (CASP3) è un biomarcatore fondamentale dell'apoptosi [13]. Pu et al. hanno osservato che un'elevata espressione di CASP3 è significativamente associata a una maggiore sopravvivenza dei pazienti con BC [14].

La proteina PI3K è uno dei principali bersagli terapeutici per il trattamento del cancro [15].

Alpelisib o BYL719 (commercializzato con il marchio Piqray®) è un inibitore orale specifico di PI3K α che sopprime selettivamente p110 α ; è stato approvato per l'uso sia dalla Food and Drug Administration statunitense che da Anvisa nel 2019, sulla base dei risultati dello studio di fase III SOLAR-1 (NCT027318) [16]. Questo farmaco agisce bloccando gli effetti degli enzimi PI3K riducendo così la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali [17]. Il farmaco è indicato per le donne in postmenopausa e anche per gli uomini con carcinoma mammario metastatico o avanzato con mutazione in PIK3CA, ER/PR+ e HER2- [18].

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è meglio conosciuta per essere sintetizzata e secreta dalla ghiandola pineale, principalmente di notte. La produzione circadiana di melatonina viene interrotta quando si verifica l'esposizione alla luce durante il periodo di oscurità [19]. La melatonina ha effetti oncostatici, antimetastatici e antiangiogenici come documentato in molte diverse condizioni sperimentali [20], [21]. Molte altre cellule producono anche melatonina ma non in modo circadiano né rilasciano il prodotto sintetizzato [22], [23].

Sia Alpelisib che Melatonina alterano l'espressione proteica dei bersagli della via PI3K/AKT/mTOR. Il potenziamento delle azioni oncostatiche di Alpelisib sarebbe auspicabile perché, sebbene siano state osservate risposte parziali e stabilizzazione a lungo termine nei tumori mammari con mutazione in PIK3CA trattati con inibitori di PI3K, la maggior parte di questi tumori non mostra una regressione sostanziale [24]. In questo contesto, questo studio ha valutato l'azione sinergica di Alpelisib e melatonina nelle linee di carcinoma mammario con mutazione H1047R in PIK3CA, con particolare attenzione alla vitalità cellulare e alla migrazione, nonché all'espressione di PI3K, p-AKT, mTOR, HIF-1 α e CASP3.

2. Materiali e Metodi

Per questo studio in vitro, sono state usate le seguenti linee cellulari di cancro al seno umano:

- 1) MDA-MB-468 (triplo negativo),
- 2) MDA-MB-453 (PIK3CA mutazione H1047R, triplo negativo)

3) T-47D (mutazione PIK3CA H1047R, luminale A)

Le colture sono state coltivate in terreno Dulbecco modificato (DMEM) ad alto contenuto di glucosio, integrato con il 10 % di siero bovino fetale (FBS) e soluzione di penicillina . Sono stati divisi in quattro gruppi di trattamento: 1) controllo; (2) Melatonina; (3) Alpelisib; e (4) Alpelisib + Melatonina. In questo colture sono state studiate: la vitalità e la migrazione cellulare, l'espressione proteica di PI3K, p-AKT, mTOR, HIF-1 α e caspasi-3.

3. Risultati

- Le linee cellulari MDA-MB -453 e T-47D mostrano un'elevata espressione di PIK3CA e proteina PI3K
- Il trattamento combinato di alpelisib e melatonina riduce la vitalità nella linea cellulare MDA-MB-453
- La combinazione di alpelisib e melatonina riduce la migrazione nella linea cellulare T-47D
- L'espressione della proteina PI3K è ridotta nelle cellule MDA-MB-453 dopo la combinazione di alpelisib e melatonina
- L'espressione della proteina p-AKT diminuisce nelle cellule T-47D dopo aver combinato alpelisib e melatonina
- mTOR è ridotto nelle cellule MDA-MB-453 dopo la combinazione di alpelisib con melatonina
- L'espressione di HIF-1 α diminuisce nelle cellule MDA-MB-453 e T-47D dopo alpelisib e melatonina
- L'espressione di CASP3 è aumentata nelle cellule MDA-MB-453 e T-47D dopo la combinazione di alpelisib e melatonina

4. Discussione

Lo scopo principale di questo studio era determinare se esiste un'azione sinergica di Alpelisib e Melatonina nelle linee cellulari di cancro al seno portatrici della mutazione del gene H1047R in PIK3CA.

Abbiamo utilizzato le cellule MDA-MB-453 e T-47D poiché hanno un'elevata espressione genica PIK3CA.

Alpelisib è principalmente indicato per le donne con cancro al seno avanzato, ER/PR+ e HER2 negativo; questo profilo corrisponde al fenotipo della cellula T-47D. Tuttavia, sono stati osservati risultati interessanti anche nella linea MDA-MB-453 del triplo negativo, specialmente quando Alpelisib era associato a Melatonina. Questo fatto corrobora l'ipotesi iniziale che la melatonina possa potenziare l'azione di questo farmaco nelle donne con TNBC che non hanno ancora un protocollo di trattamento completamente stabilito.

Il meccanismo dell'azione di Alpelisib nelle cellule neoplastiche del seno è già ben stabilito e documentato. Tuttavia, esistono diversi meccanismi attraverso i quali la Melatonina esercita i suoi ruoli antiproliferativi [26], antiangiogenici [31], antimetastatici [20] e pro-apoptotici [32] e alcune ipotesi sono già state avanzate. Pertanto, è stato osservato che la melatonina lega e attiva due tipi distinti di recettori accoppiati a proteine G legati alla membrana, MT1 e MT2, così come i recettori

nucleari RZR/ROR α , membri della super-famiglia dei recettori degli ormoni steroidei/tiroidei [33]. MT1 e MT2 sono espressi nelle cellule umane e nelle cellule neoplastiche, mentre le cellule BC esprimono il recettore MT1 [26].

I recettori della melatonina sono comuni per le cellule del cancro al seno ER +. Questi recettori hanno una bassa espressione nelle cellule mammarie che hanno un fenotipo di recettore triplo negativo [34]. Tuttavia, attivando MT1, la melatonina sopprime lo sviluppo del cancro attraverso un ampio spettro di meccanismi con e senza coinvolgimento di ER [35]. Così, Oprea-Ilieset al. [36] hanno dimostrato che anche nei tumori al seno con recettori tripli negativi, la positività MT1 era associata a uno stadio e dimensioni del tumore più piccoli al momento della diagnosi.

La melatonina esercita proprietà antitumorali mediante meccanismi complessi che non coinvolgono la via del recettore [37]. Attraverso processi non mediati dai recettori, la melatonina modula l'omeostasi redox, specialmente a livello dei mitocondri, per inibire la proliferazione delle cellule tumorali [38]. Mentre la melatonina è un potente antiossidante nelle cellule normali, nelle cellule patologiche può anche funzionare come agente pro-ossidante [39].

In questo studio, sia Melatonina che Alpelisib hanno ridotto la vitalità cellulare e la migrazione nelle cellule portatrici di mutazione, MDA-MB-453 e T-47D. Tuttavia, quando Alpelisib è stato utilizzato insieme alla melatonina, la diminuzione della vitalità cellulare è stata più pronunciata nella cellula MDA-MB-453; la riduzione della migrazione cellulare è stata più pronunciata nella cellula T-47D rispetto all'uso esclusivo di Alpelisib.

L'efficacia della melatonina nella soppressione del carcinoma mammario ER+ è particolarmente evidente, ha un marcato effetto inibitorio sulla risposta proliferativa delle cellule [26]. Ciò conferma i risultati ottenuti nell'analisi della vitalità cellulare delle cellule T-47D, che includeva sia cellule ER+ che PR+; qui, abbiamo osservato una riduzione di circa il 41% della vitalità delle cellule trattate con la sola melatonina.

Tuttavia, non vi era alcuna differenza nella vitalità delle cellule T-47D rispetto alle cellule trattate con Alpelisib o a quelle incubate con Alpelisib + Melatonina; questo non era inaspettato poiché Alpelisib è un trattamento efficace per questo tipo di cancro. Quindi, presumibilmente, la melatonina non ha avuto un effetto sinergico perché Alpelisib ha già raggiunto il pieno potenziale terapeutico nelle cellule T-47D.

Wang et al. [32] hanno analizzato la proliferazione cellulare nella linea cellulare triplo negativo MDA-MB-361 e i risultati hanno mostrato che il trattamento con melatonina alla concentrazione farmacologica (0,6-1 mM) per 72h ha inibito la proliferazione cellulare in modo dose-dipendente. Inoltre, il trattamento di questa stessa linea cellulare con 10 μ M di PI3K inibitore-IV ha ridotto la proliferazione cellulare e questa inibizione ha mostrato un aumento non statisticamente significativo se usata in combinazione con la melatonina [32].

Al contrario, i nostri risultati hanno mostrato che la melatonina ha potenziato l'effetto di Alpelisib nella cellula tripla negativa MDA-MB-453, riducendo la vitalità cellulare di circa il 35 %. Pertanto, le azioni della melatonina utilizzate in combinazione con l'inibitore specifico di PI3K- α erano sinergiche, poiché le cellule MDA-MB-453 hanno la mutazione PIK3CA e Alpelisib è un bersaglio

di PI3K [11]. Ad oggi, nessuno studio ha valutato l'azione combinata di Alpelisib e Melatonina sulla vitalità cellulare delle cellule di carcinoma mammario.

Alpelisib ha ridotto la capacità migratoria delle cellule con la mutazione H1047R. Tuttavia, questa riduzione è stata ancora più pronunciata nel T-47D, quando queste cellule hanno ricevuto la combinazione di trattamento con Alpelisib + Melatonina. Pertanto, ancora una volta abbiamo osservato l'effetto sinergico della melatonina sull'inibitore specifico di PI3K α nelle linee cellulari portatrici della mutazione PIK3CA.

Poiché le cellule MDA-MB-468 triplo negative non hanno la mutazione in PIK3CA, i nostri risultati hanno mostrato che Alpelisib non ha alterato la vitalità cellulare e la migrazione. Tuttavia, la melatonina ha ridotto la migrazione delle cellule MDA-MB-468 di circa il 55%, come notato da Jardin et al. [40]. Questi autori hanno dimostrato che la melatonina riduce significativamente la capacità migratoria delle cellule MDA-MB-468. Hanno anche menzionato che la melatonina induce effetti simili nelle cellule MDA-MB-231, suggerendo che queste azioni potrebbero essere specifiche nelle cellule TNBC [40]. Allo stesso modo, qui abbiamo osservato che dopo 24 ore di trattamento con melatonina, c'era una significativa attenuazione nell'invasione e migrazione delle cellule di cancro al seno triplo negativo MDA-MB-231 [20].

L'inibizione di PI3K rappresenta una strategia potenzialmente promettente per il trattamento del carcinoma mammario [24]. Chen et al. [41] hanno dimostrato che la melatonina sopprime la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR in modo dipendente dal tempo, inibendo la fosforilazione di PI3K, AKT e mTOR. Frigieri et al. [42] suggeriscono che la melatonina attivi i loro recettori, riducendo l'espressione dei geni PI3K/AKT; questa riduzione sarebbe presumibilmente un importante contributo all'effetto benefico della melatonina nel ridurre la carcinogenesi.

I risultati attuali hanno mostrato che la melatonina diminuisce la PI3K in tutte le linee cellulari. Questo cambiamento è stato più pronunciato nelle cellule MDA-MB-453, quando la melatonina è stata associata ad Alpelisib. Questi dati sono simili a quelli di Vora et al. [24] in cui gli inibitori di PI3K non erano efficaci come agenti di per sé. Pertanto, suggeriamo l'effetto sinergico di Melatonina e Alpelisib sull'inibizione di PI3K nella linea cellulare TNBC portatrice della mutazione H1047R.

Qui, riportiamo che la melatonina inibisce l'espressione proteica dell'AKT fosforilato, sia nella linea cellulare non mutata (MDA-MB-468) che nelle linee cellulari mutate (MDA-MB-453 e T-47D). Questi risultati supportano rapporti precedenti che mostrano che l'espressione di AKT è modulata dalla melatonina [42].

Nel carcinoma mammario, Proietti et al. [43] ha osservato che il trattamento con melatonina ha ridotto significativamente l'AKT fosforilata, ma non un'aumentata espressione di PTEN, che potrebbe essere un evento precursore, prima della regolazione negativa dell'AKT fosforilata.

Yuan et al. [44] hanno dimostrato che il trattamento con Alpelisib ha ridotto significativamente i livelli di AKT fosforilata nelle cellule T-47D, come osservato nel nostro studio, l'AKT fosforilato è stato drasticamente ridotto nelle cellule T-47D quando sono trattate con Melatonina + Alpelisib.

Ancora una volta, questi risultati indicano che la Melatonina in associazione con Alpelisib ha azioni sinergiche.

L'attivazione di mTOR svolge un ruolo importante nella sintesi proteica e nell'attivazione proteica per il controllo del ciclo cellulare. Tuttavia, partecipa anche alla sintesi dei fattori di crescita tumorale, contribuendo alla patogenesi del cancro [42]. Secondo Jung et al. [45], la melatonina (12 mM) regola negativamente la fosforilazione di mTOR nella linea cellulare TNBC MDA-MB-231, che non porta la mutazione H1047R. Allo stesso modo, il presente studio ha rivelato che il trattamento con melatonina nelle cellule TNBC (MDA-MB-468), anch'esse prive della mutazione H1047R, ha ridotto l'espressione di mTOR.

Abbiamo osservato una diminuzione dell'espressione della proteina mTOR in tutti i gruppi di trattamento nelle linee cellulari portatrici della mutazione in PIK3CA (MDA-MB-453 e T-47D). Le cellule MDA-MB-453 hanno avuto una riduzione più pronunciata quando trattate con Melatonina + Alpelisib, confermando così l'effetto sinergico nella regolazione negativa di mTOR. Questo è il primo studio che ha valutato l'azione congiunta di Alpelisib e Melatonina sull'espressione di mTOR.

Wang et al. [32] hanno riferito che la melatonina può inibire la segnalazione mTOR tramite il suo recettore MT1. Secondo Jung et al. [45] la melatonina regola in modo negativo la fosforilazione di mTOR nelle cellule MDA-MB-231, che mancano della mutazione H1047R.

Allo stesso modo, il presente studio ha rivelato che la melatonina ha ridotto l'espressione di mTOR nelle cellule MDA-MB-468, anch'esse prive della mutazione H1047R. Relativamente ad Alpelisib, Yuan et al. [44] hanno osservato che questo farmaco è in grado di inibire le proteine a valle di mTOR. Tuttavia, l'inibizione era più pronunciata nelle cellule ER+, come le cellule T-47D. Secondo alcuni autori [43], [44], [46], [47], Alpelisib esercita un effetto importante sulle proteine del complesso 1 di mTOR, e la sensibilità delle cellule tumorali ad Alpelisib dipende da questo effetto. Così Vora et al. [24] suggeriscono che la sensibilità delle cellule T-47D e MDA-MB-453 all'Alpelisib potrebbe dipendere dalla sua capacità di sopprimere la segnalazione mTOR.

L'HIF è fondamentale nella modulazione dell'angiogenesi tumorale [48]. Le proprietà anticarcinogeniche della melatonina sono mediate dalla soppressione del metabolismo del tumore e dalle vie di segnalazione come PI3K/AKT e HIF-1 α [49]. È stato dimostrato che la melatonina riduce l'espressione di HIF-1 α in diversi tipi di cancro, incluso il BC [26].

I risultati del presente studio hanno rivelato che la melatonina riduce l'espressione proteica di HIF-1 α nelle cellule MDA-MB-468, come osservato anche da Marques et al. [30] Questo gruppo ha documentato che la melatonina (1 mM) ha regolato positivamente la riduzione mediata da Mir-152-3p dei livelli di proteina HIF-1 α nelle cellule MDA-MB-468[30]. Poiché il trattamento combinato ha ridotto l'espressione di HIF-1 α nelle linee cellulari MDA-MB-453 e T-47D, abbiamo presunto che la melatonina sia in grado di potenziare le azioni dell'inibitore PI3K, Alpelisib, nelle cellule con mutazione H1047R.

Il CASP3 pro-apoptotico svolge un ruolo importante nell'apoptosi cellulare e pertanto è diventato un bersaglio per i trattamenti contro il cancro [50]. Questo studio ha mostrato una maggiore espressione di CASP3 nelle cellule con mutazione H1047R, MDA-MB-453 e T-47D quando trattate

con melatonina. Allo stesso modo, Wang et al. [32] hanno riferito che la melatonina stimola le attività e la scissione della caspasi 3/9, inibendo così la proliferazione cellulare e inducendo l'apoptosi nelle cellule MDA-BC. Alpelisib agisce anche sull'espressione di CASP3. Maida et al. [11] utilizzando il test Caspase-Glo 3/7, hanno osservato che Alpelisib ha inibito la proliferazione cellulare sopprimendo la fosforilazione di AKT e inducendo apoptosi nelle linee cellulari di emangiosarcoma canino con mutazione PIK3CA. In questo studio, Alpelisib+Melatonina ha mostrato un effetto sinergico sull'espressione di CASP3, che promuove l'apoptosi delle cellule con mutazione PIK3CA.

Conclusioni

In generale, abbiamo osservato il potenziamento dell'effetto di Alpelisib da parte della Melatonina, in particolare nel TNBC portatore della mutazione H1047R in PIK3CA (MDA-MB-453); in questo caso, la terapia combinata ha aumentato le riduzioni della vitalità cellulare e della migrazione rispetto a quelle causate da entrambi i trattamenti da soli. Questa combinazione di farmaci ha ridotto l'espressione proteica di PI3K, p-AKT, mTOR, HIF-1 α aumentando l'espressione di CASP3.

Questi risultati possono incoraggiare studi clinici con carcinomi mammari portatori della mutazione H1047R in cui la combinazione di melatonina e Alpelisib potrebbe essere utile. Oltre ad avere azioni sinergiche con Alpelisib, la melatonina riduce comunemente la tossicità collaterale delle chemioterapie e migliora il benessere del paziente.