

Titolo: "Inibizione della crescita e induzione dell'apoptosi da parte del fenretinide nelle linee cellulari di cancro polmonare a piccole cellule - Growth Inhibition and Induction of Apoptosis by Fenretinide in Small-Cell Lung Cancer Cell Lines"

Codice: RET013

Autore: Kalemkerian et al.

Data: 1995

Rivista: *Journal of National Cancer Institute* 87(22): 1674-1680

Argomento: Retinoidi

Accesso libero: no

DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/87.22.1674>

URL: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/87/22/1674/939488?redirectedFrom=fulltext>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/12/07/ret013-kalemkerian-et-al-1995>

Parole chiave: retinoidi, apoptosi, differenziazione, tumore al polmone, proliferazione cellulare, geni myc

Tumore: tumore al polmone

Traduzione: le sezioni dell'articolo "Riassunto", "Introduzione", "Discussione" sono state tradotte in modo fedele all'originale. Le sezioni "Materiali e Metodi" e "Risultati" sono riportate in modo molto semplificato e sintetico.

Punti di interesse: Studi epidemiologici e segnalazioni di espressione anomala del recettore dell'acido retinoico (RAR) nei tumori polmonari maligni suggerivano che la disregolazione delle vie di segnalazione dei retinoidi potesse essere coinvolta nella patogenesi del cancro del polmone. Diversi ricercatori hanno iniziato a valutare gli effetti dei retinoidi sulle cellule tumorali del polmone notando una diminuzione della crescita, un aumento della differenziazione neuroendocrina, una diminuzione dell'espressione del gene c-myc (coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare) e un aumento della sensibilità a farmaci antineoplastici. Altri studi su linee cellulari di tumore al polmone a piccole cellule (SCLC) che sovraesprimono il gene c-myc hanno evidenziato che il trattamento con acido retinoico determinava inibizione della crescita, una diminuzione dell'espressione del gene c-myc e un aumento dell'espressione del gene RAR β (recettore beta dell'acido retinoico). Sulla base di questi risultati, in questo studio è stato testato il retinoide sintetico fenretinide (HPR) su linee cellulari SCLC con diversi profili di espressione genica myc. È stata anche verificata l'induzione all'apoptosi tramite tecniche per l'analisi del contenuto e della frammentazione del DNA. Le linee cellulari sono state analizzate per cambiamenti morfologici e induzione alla differenziazione. Tutte le linee cellulari hanno reagito al trattamento con HPR con una diminuzione della crescita cellulare, e tre delle quattro linee cellulari che reagiscono ai valori inferiori di concentrazione di HPR, sono quelle che sovraesprimono il gene c-myc.

Le cellule SCLC trattate con HPR hanno mostrato restringimento e condensazione della cromatina, seguita da frammentazione nucleare (induzione all'apoptosi). A differenza delle cellule SCLC

esposte a acido retinoico (RA), le cellule trattate con HPR non hanno mostrato cambiamenti morfologici indicativi di differenziazione neuroendocrina.

I risultati del presente studio suggeriscono che gli effetti biologici di RA e HPR sono mediati attraverso diversi percorsi molecolari. Il meccanismo attraverso il quale l'HPR induce l'apoptosi rimane poco chiaro.

In questo studio, è stato dimostrato che l'HPR inibisce la crescita di cellule di tumore al polmone a piccole cellule e induce l'apoptosi a concentrazioni di farmaco clinicamente rilevanti.

Traduzione articolo

Riassunto

Background: Il cancro del polmone è la principale causa di morte correlata al cancro negli Stati Uniti, con il cancro del polmone a piccole cellule (SCLC) che costituisce circa il 20% di tutti i casi di cancro del polmone. Numerosi studi epidemiologici e molecolari hanno suggerito che le alterazioni nelle vie di segnalazione dei retinoidi svolgono un ruolo nella patogenesi del cancro del polmone. Fenretinide [N-(4-idrossifenil)retinammide; HPR] è un retinoide sintetico con tossicità minima e farmacocinetica favorevole durante la somministrazione a lungo termine ai pazienti coinvolti negli studi clinici.

Scopo: Lo scopo di questa indagine era studiare l'effetto dell'HPR sulla crescita delle cellule SCLC in vitro.

Metodi: sette linee cellulari SCLC (NCI-H69, NCI-H82, NCI-H146, NCI-H209, NCI-H345, NCI-H446 e NCI-H510A) sono state esposte continuamente a un'ampia gamma di concentrazioni di HPR o di acido tutto trans retinoico (RA) e la vitalità cellulare è stata determinata il giorno 3 e il giorno 7 mediante il test di esclusione del colorante trypan blue. La crescita di queste cellule è stata confrontata con quella delle cellule trattate con il veicolo di controllo per determinare la frazione di sopravvivenza e la dose risultante in un'inibizione della crescita del 50% rispetto alla crescita delle cellule di controllo (IC50). L'induzione dell'apoptosi è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza, analisi del contenuto di DNA e un test basato sulla deossiribonucleotidil transferasi terminale che etichetta le estremità idrossiliche in 3' dei frammenti di DNA (saggio TUNEL) combinato con l'analisi citometrica a flusso.

Risultati: l'HPR ha inibito di linee cellulari SCLC a valori IC50 compresi tra 0,1 e 3,0 microM (concentrazioni clinicamente ottenibili). In tutte le linee cellulari testate, l'HPR si è rivelato un inibitore della crescita più potente dell'RA. Utilizzando la microscopia a fluorescenza, è stato scoperto che l'HPR induce cambiamenti morfologici coerenti con l'apoptosi nelle cellule SCLC NCI-H82, tra cui il restringimento cellulare, la condensazione della cromatina e la frammentazione nucleare. L'analisi citometrica a flusso ha rivelato una diminuzione del contenuto di DNA e il test TUNEL ha mostrato un aumento dell'incorporazione di digossigenina uridina trifosfato nelle cellule SCLC NCI-H82 trattate con HPR; questi risultati sono coerenti con l'induzione dell'apoptosi.

Conclusioni: l'HPR ha inibito la crescita in vitro delle cellule SCLC. Nelle cellule NCI-H82, l'HPR ha inibito la crescita attraverso l'induzione dell'apoptosi.

Introduzione

Il cancro al polmone continua ad essere una delle principali preoccupazioni sanitarie negli Stati Uniti, con 169.900 nuovi casi e 157.000 decessi stimati nel 1995 (7). Il cancro del polmone a piccole cellule (SCLC) è un'entità clinico-patologica distinta che costituisce circa il 20% di tutti i casi di cancro del polmone. Il SCLC è caratterizzato da differenziazione neuroendocrina, potenziale metastatico precoce e risposta iniziale alla radioterapia e alla chemioterapia. Nonostante le risposte

iniziali favorevoli, quasi tutti i pazienti con SCLC alla fine recidivano e muoiono per malattia resistente al trattamento (2). Sebbene la nostra comprensione della biologia del SCLC sia in rapida espansione, non ci sono stati recenti grandi progressi nel trattamento del SCLC e la sopravvivenza globale non è cambiata in modo significativo dalla fine degli anni '70 (5).

I retinoidi sono una classe di analoghi della vitamina A che svolgono un ruolo importante nella crescita e nella differenziazione di vari tipi di cellule benigne e maligne. Numerosi studi epidemiologici (4) e molecolari (5,6) hanno suggerito che le alterazioni nelle vie di segnalazione dei retinoidi svolgono un ruolo nella patogenesi del cancro del polmone. È stato riscontrato che l'acido trans retinoico (RA), un metabolita naturale della vitamina A (retinolo), possiede una modesta attività inibitoria della crescita contro il 30% delle linee cellulari di cancro del polmone (5). Inoltre, è stato segnalato che blocca la transizione verso un fenotipo resistente al trattamento in un modello in vitro di progressione del SCLC utilizzando la linea cellulare SCLC NCI-H82 (7) e altera l'espressione dell'RNA messaggero sia di c-myc che di L-myc, aumentando la differenziazione neuroendocrina, nelle cellule SCLC NCI-H82 (7,5). Sebbene siano in corso studi clinici sull'uso dell'acido retinoico in pazienti affetti da SCLC, i profili di tossicità e farmacocinetica sembrano non ottimali per la somministrazione a lungo termine (9). Fenretinide [N-(4-idrossifenil)retinammide; HPR] è un retinoide sintetico che mostra una tossicità minima e profili farmacocinetici favorevoli, con concentrazioni plasmatiche allo stato stazionario e un'emivita plasmatica che rimane stabile anche dopo 5 anni di somministrazione continua ai pazienti negli studi clinici (10-12). In recenti studi in vitro, è stato osservato che l'HPR induce apoptosi nelle linee cellulari ematopoietiche maligne (13) e neuroblastoma (14), comprese quelle che mostrano resistenza agli effetti di altri retinoidi. Visto i nostri precedenti studi con l'acido retinoico nel SCLC (7), la tossicità favorevole e i profili farmacocinetici dell'HPR e la potente attività dell'HPR in diversi altri tipi di cellule maligne, incluso il neuroblastoma (un tumore neuroendocrino che condivide diverse caratteristiche clinico-patologiche con SCLC), abbiamo avviato un esame degli effetti dell'HPR su un pannello di linee cellulari SCLC.

Materiali e Metodi/Risultati

Sette linee cellulari umane di tumore al polmone a piccole cellule (SCLC) (NCI-H69, NCI-H82, NCI-H146, NCI-H209, NCI-H345, NCI-H446 e NCI-H510A) sono state esposte continuamente a un'ampia gamma di concentrazioni di HPR e di acido tutto trans retinoico (RA). La vitalità cellulare è stata determinata il giorno 3 e il giorno 7. La crescita di queste cellule è stata confrontata con quella delle cellule trattate con il veicolo di controllo per determinare la frazione di sopravvivenza e la dose risultante in un'inibizione della crescita del 50% rispetto alla crescita delle cellule di controllo (IC50). È stata anche valutata l'induzione dell'apoptosi mediante le tecniche specifiche (indicatori di frammentazione e riduzione del DNA). I risultati indicano che il trattamento con HPR causa: inibizione della crescita e induzione dell'apoptosi.

Discussione

Il recente interesse nell'uso dei retinoidi per la prevenzione e il trattamento delle malattie neoplastiche deriva dal loro coinvolgimento nella proliferazione e differenziazione di numerosi tipi di cellule normali e maligne. Nel polmone normale, i retinoidi svolgono un ruolo importante nella differenziazione cellulare della mucosa bronchiale (24). Numerosi studi epidemiologici (4) e segnalazioni di espressione anomala del recettore dell'acido retinoico (RAR) nei tumori polmonari maligni (5,6) hanno suggerito che la disregolazione delle vie di segnalazione dei retinoidi potrebbe essere coinvolta nella patogenesi del cancro del polmone. Sulla base di questi risultati, diversi ricercatori hanno iniziato a valutare gli effetti dei retinoidi sulle cellule tumorali del polmone. Doyle et al. (8) hanno esposto cellule SCLC a 1,0 µM di RA e hanno notato una diminuzione della crescita, un aumento della differenziazione neuroendocrina, una diminuzione dell'espressione del

gene c-myc (coinvolto nella proliferazione cellulare) e un aumento della sensibilità al farmaco antineoplastico etoposide. Successivamente, Geradts et al. (5) hanno riportato una modesta inibizione della crescita nel 30% delle linee cellulari di cancro al polmone dopo il trattamento con 1,0 μ M di RA. Noi (7) abbiamo precedentemente riportato che il trattamento delle cellule SCLC NCI-H82 (che sovraesprimono l'oncogene c-myc) con 1,0 μ M di RA ha comportato l'inibizione della crescita, una diminuzione dell'espressione del gene c-myc e un aumento dell'espressione del gene L-myc e RAR β . Nel presente studio, estendiamo queste osservazioni segnalando che HPR, un retinoide sintetico con tossicità clinica minima, è un inibitore più potente della crescita di SCLC in vitro rispetto all'RA e induce l'apoptosi nelle cellule SCLC NCI-H82. Precedenti studi (5,7) hanno suggerito che la reattività delle cellule SCLC ai retinoidi potrebbe essere correlata alla sovraespressione degli oncogeni myc. Pertanto, abbiamo selezionato un gruppo di linee cellulari SCLC con diversi profili di espressione genica myc. Tre delle linee cellulari studiate (NCI-H82, NCI-H146 e NCI-H446) sovraesprimono l'oncogene c-myc, due (NCI-H209 e NCI-H510A) sovraesprimono L-myc, una (NCI-H69) sovraesprime N-myc e una (NCI-H345) non mostra alcuna sovraespressione del gene myc (21). Sebbene sia difficile trarre conclusioni sulla base di questo piccolo campione di linee cellulari, è interessante notare che tre delle quattro linee cellulari con valori di IC50 inferiori a 1,0 μ M HPR sovraesprimono il gene c-myc. Sono in corso ulteriori esperimenti per valutare il potenziale ruolo della sovraespressione del gene c-myc nell'apoptosi mediata da HPR.

L'HPR è stato ampiamente studiato come agente chemiopreventivo e si è dimostrato attivo contro lo sviluppo di carcinomi mammari, polmonari, vescicali, cutanei e prostatici in una varietà di modelli animali sperimentali di carcinogenesi (25).

Sono attualmente in corso numerosi studi clinici per valutare l'utilità chemiopreventiva dell'HPR nei tumori umani della mammella, del polmone, della prostata e della vescica. Un minor numero di studi hanno valutato il potenziale chemioterapico dell'HPR. Un primo rapporto (26) ha osservato che l'HPR aveva solo una modesta attività nell'inibire la formazione di colonie di tumori solidi umani nell'agar molle. Studi successivi (25,27) hanno dimostrato che l'HPR ha avuto un'attività significativa contro i tumori mammari di ratto accertati e contro gli xenotrapianti di cancro al seno umano nei topi nudi. È stato inoltre riportato che l'HPR inibisce la crescita delle linee cellulari di carcinoma della prostata umana e di ratto (28) e potenzia l'attività del cisplatino nella soppressione degli xenotrapianti di cancro ovarico umano (29). Nonostante questi dati preclinici favorevoli, l'HPR è risultato inattivo in uno studio clinico di fase II in pazienti con cancro al seno e melanoma (30). Più recentemente, è stato riportato che l'HPR inibisce marcatamente la crescita di linee cellulari maligne mieloidi, linfoidi e neuroblastoma attraverso l'induzione dell'apoptosi, anche in linee cellulari resistenti all'acido retinoico (RA) (73,74,37).

Nel nostro presente studio, sono stati utilizzati tre criteri indipendenti per stabilire l'induzione dell'apoptosi: 1) alterazioni morfologiche, 2) diminuzione del contenuto di DNA e 3) aumento di frammentazione del DNA. Le cellule SCLC trattate con HPR hanno mostrato restringimento e condensazione della cromatina, seguite da frammentazione nucleare. A differenza delle cellule SCLC esposte a RA, queste cellule trattate con HPR non hanno mostrato cambiamenti morfologici indicativi di differenziazione neuroendocrina (8). Questi risultati sono coerenti con i rapporti che hanno rilevato una mancanza di differenziazione cellulare dopo il trattamento con HPR nelle cellule ematopoietiche maligne (13) e neuroblastoma (57) e suggeriscono che gli effetti biologici di RA e HPR sono mediati attraverso diversi percorsi molecolari. Il meccanismo attraverso il quale l'HPR induce l'apoptosi rimane poco chiaro. Nelle cellule ematopoietiche maligne, non vi è stato alcun effetto evidente sull'espressione di diversi mediatori/geni noti dell'apoptosi (32). I nostri dati preliminari e non pubblicati suggeriscono anche che l'HPR non altera in modo significativo l'espressione di alcuni geni coinvolti nel determinare l'apoptosi nelle cellule SCLC. Sono in corso

studi per valutare ulteriormente i meccanismi coinvolti nell'induzione dell'apoptosi nelle cellule SCLC.

Studi clinici hanno dimostrato che concentrazioni sieriche di HPR nell'intervallo 1,0-3,0 μM sono ottenibili con una tossicità relativamente ridotta, suggerendo che concentrazioni sieriche e tissutali più elevate possono essere farmacologicamente ottenibili (70). L'IC50 dell'HPR in ciascuna delle nostre sette linee cellulari SCLC rientrava o era inferiore a questo intervallo di concentrazioni sieriche clinicamente ottenibili. Ad una concentrazione di 10,0 μM HPR, tutte e sette le linee cellulari hanno mostrato alta percentuale di uccisione cellulare. Poiché la dose massima tollerata di HPR non è stata stabilita con certezza negli studi di fase I, è possibile che si possano raggiungere concentrazioni sieriche superiori a 3,0 μM con una tossicità tollerabile.

In questo studio, abbiamo dimostrato che l'HPR inibisce la crescita di SCLC e induce l'apoptosi a concentrazioni di farmaco clinicamente rilevanti. Questi dati suggeriscono che sono ragionevoli ulteriori studi per valutare l'utilità dell'HPR nel trattamento del SCLC.