

Titolo: Prolattina: il terzo ormone nel tumore al seno - Prolactin: The Third Hormone in Breast Cancer

Codice: PRL016

Autore: Schuler e O'Leary

Data: 2022

Rivista: *Frontiers in Endocrinology*

Argomento: prolattina

Accesso libero: si

DOI/URL: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.910978>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2026/10/05/prl016-schuler-e-oleary-2022/>

PANORAMICA VIDEO (IA): <https://youtu.be/p1XW3LOKyF8>

Parole chiave: prolattina (PRL), recettore, isoforme, estrogeni, carcinoma mammario, HER2+, carcinoma mammario triplo negativo, fattore di trascrizione STAT5, microambiente tumorale, matrice extracellulare, angiogenesi

Tumore: carcinoma mammario

Traduzione: questa traduzione è fedele al testo originale. È disponibile anche una traduzione semplificate sul BLOG.

Punti di interesse

Paragrafo 1 - Introduzione

1. **Ruolo fisiologico e ruolo oncogenico:** La prolattina lavora in sinergia con gli ormoni steroidei ovarici (estrogeni e progesterone) per regolare lo sviluppo e la differenziazione della ghiandola mammaria, per questo esiste un suo coinvolgimento diretto nello sviluppo del tumore al seno.
2. **Origine sistemica e sintesi locale:** I recettori della prolattina nel tessuto mammario sono esposti ad agonisti provenienti sia dalla circolazione sistemica (influenzata da farmaci antipsicotici o terapie ormonali) sia dalla produzione autocrina e paracrina locale all'interno del microambiente tumorale. L'agonista più importante è il GH o ormone della crescita, che come la PRL, può essere prodotto localmente dalle cellule del carcinoma mammario, e i recettori dell'hGH e della PRL possono eterodimerizzare.
3. **Impatto della Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS) e fonti dell'ormone:** I livelli di prolattina circolante nelle donne non gravide presentano un'ampia variabilità e l'assunzione della Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS) a base di estrogeni e progestinici in menopausa costituisce un fattore esogeno che innalza direttamente i livelli ematici di prolattina. I recettori della prolattina (PRLR) nel tessuto mammario risultano quindi esposti sia all'incremento sistemico causato dalla TOS (o da farmaci antipsicotici) sia alla produzione autocrina e paracrina locale all'interno della ghiandola e delle cellule tumorali.

4. **Duplicata natura biologica e influenza del microambiente:** Il recettore della prolattina è espresso in un'elevata percentuale di tumori mammari in diversi sottotipi. L'esito dell'attivazione del recettore varia da risposte pro-differenziative a risposte che promuovono l'aggressività tumorale, in base alle proprietà della cellula neoplastica e alle caratteristiche del microambiente.

Paragrafo 2 - Azioni della PRL nello sviluppo del carcinoma mammario

1. **Evidenze epidemiologiche e rischio di tumore ER+:** Ampi studi prospettici collegano livelli ematici più elevati di prolattina a un aumento del rischio di insorgenza del carcinoma mammario positivo al recettore dell'estrogeno (ER+), sia in pre- che in post-menopausa, con un effetto indipendente dai livelli di estrogeno. La prolattina è inoltre associata a un incremento della densità mammografica.
2. **Dato epidemiologico sulla pericolosità della TOS / MHT:** Nell'analisi della coorte EPIC, le donne in post-menopausa con livelli ematici elevati di prolattina che assumevano la Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS) combinata (estrogeni + progestinici) hanno mostrato l'aumento più marcato e significativo dell'incidenza di carcinoma mammario ER+
3. **Modelli in vivo e caratterizzazione genomica:** I modelli di topi transgenici (in particolare il modello NRL-PRL, che simula la sintesi locale dell'ormone) dimostrano che la prolattina induce spontaneamente carcinomi mammari ER+ metastatici. L'analisi genomica di questi tumori rivela l'attivazione preferenziale di specifiche vie di segnalazione, unitamente a un microambiente tumorale caratterizzato da immunosoppressione.
4. **Espansione della gerarchia epiteliale e staminalità:** La prolattina agisce direttamente sull'epitelio mammario espandendo le popolazioni di cellule staminali e di progenitori luminali (ritenuti potenziali cellule d'origine di vari sottotipi tumorali) e interferendo con la normale maturazione cellulare guidata dagli ormoni steroidei attraverso la modulazione di specifici fattori.
5. **Sostegno alle lesioni precoci ed effetti sullo stroma:** L'ormone alimenta la crescita e la progressione delle lesioni preinvasive (come il carcinoma duttale in situ, DCIS) e condiziona le cellule non epiteliali del microambiente. In particolare, la prolattina influenza la risposta immunitaria locale, stimola la sintesi della matrice extracellulare e regola i processi di angiogenesi.
6. **Cooperazione sinergica con steroidi e fattori oncogenici:** La prolattina interagisce strettamente con estrogeni e progesterone (anche somministrati per la TOS) attraverso la regolazione reciproca dei recettori e la diafonia molecolare. Inoltre, la concomitanza di prolattina ed elementi oncogenici (come l'aumento di TGF-alfa, la perdita di p53 o mutazioni nel gene APC) riduce drasticamente i tempi di comparsa del tumore e promuove l'attivazione di ERa anche in assenza di ligando estrogenico, favorendo la resistenza ai trattamenti endocrini.

Paragrafo 3 - Ruolo della PRL nei tumori mammari conclamati

1. **Difficoltà di studio del recettore della prolattina:** La rilevazione e la valutazione del recettore della prolattina nei tumori mammari presentano notevoli complessità a causa della presenza di diverse isoforme generate da splicing alternativo, come la forma lunga e la forma intermedia, che possiedono domini intracellulari distinti e differenti capacità di trasmissione del segnale. Gli studi sono stati storicamente ostacolati dalla limitata sensibilità e specificità degli anticorpi

impiegati, i quali variano a seconda che riconoscano il dominio extracellulare comune alle diverse varianti oppure i domini intracellulari specifici delle singole isoforme. A queste criticità metodologiche si aggiungono le discrepanze tra i livelli di trascritto genico e l'effettiva espressione proteica. Questi elementi possono spiegare le ampie variazioni riscontrate nella percentuale di tumori positivi al recettore (dall'83% a valori inferiori al 25%) e i dati spesso discordanti sul valore prognostico del recettore nei vari sottotipi tumorali.

2. **Espressione del recettore ed effetto delle diverse isoforme nei tumori stabiliti:** Il recettore della prolattina viene espresso in una percentuale compresa tra il 25% e l'83% nei vari sottotipi di carcinoma mammario, tra cui i tumori ER+, HER2+ e i tripli negativi. L'esito biologico della segnalazione dipende in modo critico dalle isoforme del recettore espresse, come la forma lunga o la forma intermedia; quest'ultima, altamente presente in un sottogruppo di tumori tripli negativi, inibisce la via pro-differenziativa di STAT5A ed è correlata a una maggiore probabilità di metastasi a distanza.
3. **Il modello NSG-Pro e l'impatto della prolattina nei tumori ER+:** L'impiego del modello murino NSG-Pro, che esprime prolattina umana a livelli fisiologici, dimostra che l'ormone aumenta di 15-20 volte il tasso di attecchimento dei xenotrapianti derivati da pazienti con tumori ER+, favorendo la disseminazione metastatica e la progressione della malattia. Negli xenotrapianti tradizionali i risultati sono apparsi più eterogenei, principalmente a causa delle marcate differenze tra le linee cellulari e della mancanza di un sistema immunitario funzionale nei topi immunocompromessi.
4. **Progressione e resistenza alle terapie endocrine e chemioterapiche:** L'interazione tra la prolattina, estrogeni e progesterone gioca un ruolo cruciale nella progressione tumorale e nel fallimento delle terapie oncologiche. L'esposizione prolungata alla prolattina ad estrogeni e progesterone promuove lo sviluppo della resistenza al tamoxifene e agli anti-estrogeni nei tumori ER+, inducendo l'attivazione del recettore dell'estrogeno alfa anche in assenza di ligando. Inoltre, la prolattina riduce l'efficacia di vari chemioterapici come doxorubicina, paclitaxel e cisplatino, stimolando proteine anti-apoptotiche e trasportatori di efflusso come ABCG2.
5. **Riprogrammazione delle vie di segnalazione da parte della matrice extracellulare:** La prolattina attiva sia la via canonica JAK2-STAT5A, associata a tumori meglio differenziati e a una maggiore sensibilità ai trattamenti, sia vie non canoniche come FAK, Src, AKT ed ERK1/2. Quando la matrice extracellulare diventa rigida e desmoplastica, il segnale della prolattina viene riprogrammato e spostato dalla via differenziativa JAK2-STAT5A verso la via FAK-Src-ERK1/2, trasformando la prolattina in uno stimolo pro-invasivo e potenziando ulteriormente la resistenza al tamoxifene.
6. **Nuove prospettive terapeutiche e vettorializzazione mirata:** Poiché l'inibizione della prolattina usata come monoterapia non ha mostrato una sufficiente efficacia nei primi trial clinici, la ricerca si sta orientando verso l'uso del recettore della prolattina come bersaglio specifico. Vengono attualmente sviluppati anticorpi coniugati a farmaci citotossici e anticorpi

bispecifici in grado di reclutare i linfociti T, sfruttando l'elevata espressione del recettore per veicolare terapie mirate direttamente sulle cellule tumorali.

Paragrafo 4 – Riepilogo dello studio

1. Solide evidenze epidemiologiche e sperimentali confermano che livelli elevati di prolattina aumentano il rischio di insorgenza del carcinoma mammario
2. L'ormone interagisce in modo complesso con estrogeni e progesterone
3. Indipendentemente dagli ormoni ovarici, la prolattina altera la gerarchia dell'epitelio mammario, espande le popolazioni di cellule progenitrici e favorisce la comparsa di anomalie duttali fino allo sviluppo di carcinomi metastatici aggressivi.
4. La prolattina agisce sulle cellule stromatiche e sul sistema immunitario. L'elevata espressione del suo recettore nelle lesioni precoci come il carcinoma duttale in situ suggerisce un suo coinvolgimento attivo fin dalle prime fasi del processo oncogenico.
5. Nei tumori già stabiliti, il ruolo della prolattina è più sfaccettato e condizionato dal contesto. La risposta delle cellule tumorali varia in base all'isoforma del recettore espressa, alle caratteristiche fisiche della matrice extracellulare e alla presenza di altri fattori di crescita.

Traduzione articolo

Riassunto

La prolattina agisce in sinergia con gli steroidi ovarici per orchestrare lo sviluppo mammario e la lattazione, processi che culminano nel nutrimento e in una serie di altri benefici, sempre più riconosciuti, per i neonati. Il suo ruolo centrale nella crescita e nel differenziamento dell'epitelio mammario suggerisce un suo coinvolgimento nel tumore al seno; tuttavia, è stato complesso definirne il contributo specifico, un passaggio essenziale per integrare tali conoscenze nelle strategie di prevenzione e trattamento. Ampi studi epidemiologici prospettici hanno associato un'elevata esposizione alla prolattina a un rischio maggiore di sviluppare la malattia, in particolare il tumore al seno ER-positivo nelle donne in post-menopausa. È risultato invece più arduo determinarne le azioni e le conseguenze cliniche in presenza di tumori già instaurati. In questa sede esaminiamo i dati sperimentali che indicano molteplici meccanismi attraverso i quali la prolattina potrebbe aumentare il rischio di tumore al seno. Valutiamo inoltre le evidenze relative al ruolo della prolattina e delle sue cascate di segnalazione a valle nella progressione della malattia e nella risposta alle terapie, discutendo infine come nuovi approcci stiano iniziando a chiarire i meccanismi biologici alla base dei risultati – apparentemente contrastanti – emersi dagli studi epidemiologici e sperimentali sugli effetti della prolattina nei diversi sottotipi di tumore al seno.

1 Introduzione

È stato ripetutamente dimostrato che i fattori che regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare-specifici svolgono un ruolo significativo nell'oncogenesi e rappresentano potenziali bersagli terapeutici nei tumori già instaurati. La prolattina (PRL) agisce in sinergia con gli steroidi ovarici – estrogeni e progesterone – per coordinare i cicli di sviluppo e differenziamento della ghiandola mammaria che portano a una lattazione efficace, garantendo il nutrimento per la prole. I meccanismi alla base dei segnali indotti dalla PRL, che determinano l'espansione delle cellule alveolari durante la gravidanza e ne coordinano il differenziamento al momento del parto, sono stati chiariti [(1–4) e riferimenti ivi citati]. Il ruolo fondamentale della PRL in questi processi fisiologici ha suggerito un suo coinvolgimento nel tumore al seno [(5–14) e riferimenti ivi citati], per analogia

con le funzioni note degli altri due ormoni principali che regolano lo sviluppo e la funzionalità mammaria: estrogeni e progesterone. Tuttavia, comprendere le attività della PRL e le sue conseguenze nei diversi quadri clinici del tumore al seno, al fine di sviluppare strategie di prevenzione o trattamento, si è rivelato complesso.

Sebbene la regolazione dell'espressione della PRL da parte delle cellule lattotrope ipofisarie durante la gravidanza e l'allattamento sia ben nota [revisione in (15)], la sua espressione al di fuori di tali condizioni è stata meno studiata. La secrezione ipofisaria di PRL è influenzata da molteplici fattori e i livelli circolanti nelle donne non in gravidanza variano notevolmente (16–18). Oltre agli stimoli fisiologici, la terapia ormonale sostitutiva (TOS) estro-progestinica per la menopausa aumenta i livelli circolanti di PRL (18), mentre i farmaci antipsicotici che antagonizzano la dopamina inducono iperprolattinemia (19, 20). Inoltre, la PRL può essere espressa anche da cellule non lattotrope, inclusa la ghiandola mammaria (21–23), e dalle stesse cellule tumorali mammarie (24–27). La COX-2 (PTGS2) è in grado di indurre l'espressione di PRL nei fibroblasti, anche in potenziali siti metastatici, attraverso l'induzione di NR4A mediata dalla PGE2 (28). Infine, a differenza di quanto avviene per l'ormone della crescita (GH) nelle specie non primati, l'hGH umano è anche un potente agonista del recettore della PRL (29, 30); analogamente alla PRL, esso può essere prodotto localmente dalle cellule tumorali mammarie (26) e i recettori per l'hGH e per la PRL possono formare eterodimeri (31). Pertanto, i recettori della PRL (PRLR) nella mammella possono essere esposti ad agonisti provenienti sia da fonti locali che sistemiche (circolanti), anche in assenza di gravidanza.

In questa sede esaminiamo le evidenze epidemiologiche che collegano la PRL all'oncogenesi mammaria, nonché i recenti studi sperimentali che suggeriscono il coinvolgimento di molteplici meccanismi sottostanti. Affrontiamo poi il ruolo, più controverso, della PRL nei tumori mammari già instaurati. Il PRLR è fortemente espresso in molti tumori mammari di tutti i diversi sottotipi; inoltre, le analisi epidemiologiche e gli studi sperimentali stanno rivelando che la PRL può indurre effetti sia di differenziamento che di progressione aggressiva della neoplasia. Discutiamo di come nuovi approcci stiano facendo luce sui fattori che determinano la risposta alla PRL – tra cui le proprietà intrinseche delle cellule tumorali e il microambiente – e indichiamo le prospettive per studi futuri volti a integrare le nostre conoscenze sul ruolo di questo ormone nella progressione del tumore mammario e nella risposta alle terapie.

2 Azioni della PRL nello sviluppo del carcinoma mammario

2.1 Studi epidemiologici

Numerosi studi epidemiologici hanno esaminato la relazione tra i livelli di PRL circolante e lo sviluppo del carcinoma mammario [meta-analisi e revisione (32)]. Ampi studi prospettici hanno associato livelli più elevati di PRL circolante – pur rimanendo entro l'intervallo di normalità – a un rischio maggiore di carcinoma mammario esprimente il recettore degli estrogeni alfa (ER+) sia in donne in post-menopausa (16, 33) che in pre-menopausa (34). In uno studio nidificato all'interno del *Nurses' Health Study*, i livelli di PRL sono risultati predittivi del rischio di carcinoma mammario indipendentemente dagli estrogeni (35). Ulteriori analisi condotte su questa coorte hanno rilevato che l'associazione tra livelli di PRL circolante nel quartile più alto (misurati dieci anni prima della diagnosi) e il tumore al seno era particolarmente marcata per le forme aggressive di carcinoma mammario ER+ (36). Inoltre, studi epidemiologici hanno collegato la PRL alla densità mammografica (34, 37, 38), un importante fattore indipendente di aumento del rischio di carcinoma mammario (39, 40). L'inclusione della PRL nei modelli di previsione del rischio ne migliora l'efficacia (34, 41). Di contro, i livelli ridotti di PRL riscontrati nelle donne che hanno partorito rispetto alle nullipare potrebbero contribuire alla protezione a lungo termine conferita dalla gravidanza (16, 18, 34, 42).

2.2 Studi sperimentali.

2.1 Modelli *in vivo*

La capacità della PRL di stimolare la tumorigenesi mammaria in modelli di roditori è nota da tempo. Molti dei primi studi prevedevano la manipolazione della PRL ipofisaria (5–7), in particolare attraverso l'uso di isotrapianti ipofisari sotto la capsula renale per elevare cronicamente i livelli di PRL circolante, eliminando così gli effetti inibitori della dopamina (43). Tale approccio permette di osservare gli effetti della PRL in combinazione con il progesterone; nei roditori, infatti, la PRL sostiene anche la funzione del corpo luteo (44).

Più recentemente, l'impiego di topi geneticamente modificati ha consentito di indagare i meccanismi attraverso i quali la PRL può aumentare il rischio di carcinoma mammario, indipendentemente dagli steroidi ovarici. L'espressione transgenica di PRL sotto il controllo di diversi promotori porta allo sviluppo di tumori mammari [revisione in (45)], così come l'espressione transgenica di STAT5A nella ghiandola mammaria, il mediatore canonico dei segnali della PRL (46). La PRL promuove lo sviluppo di tumori mammari in topi con ablazione germinale di *Stat1* secondaria a mutazioni somatiche troncanti nel gene *Prlr*; ciò porta alla produzione di una proteina derivante da splicing alternativo che ricorda l'isoforma umana "intermedia" (47) (vedi Sezioni 3.1, 3.4.2). Il nostro gruppo ha generato il modello murino NRL-PRL (48, 49), in cui la PRL di ratto transgenica è espressa dall'epitelio mammario, mimando la sintesi locale di PRL nella mammella umana (23). A differenza della PRL circolante, questa PRL localmente elevata non altera il ciclo estrale, consentendo di studiare le interazioni tra PRL e ormoni ovarici; tale aspetto è di particolare importanza nella valutazione di modelli di tumore mammario pre- e post-menopausale. Le ghiandole mammarie di femmine NRL-PRL giovani adulte mostrano livelli elevati di pERK1/2 e pAKT, oltre a pSTAT5 (50), riflettendo lo spettro delle cascate di segnalazione attivate dalla PRL (22, 51). Tali ghiandole mammarie presentano sia anomalie duttali (neoplasie intraepiteliali mammarie, simili al carcinoma duttale *in situ* o DCIS) sia iperplasie epiteliali (48, 52). Con l'avanzare dell'età, le femmine nullipare sviluppano spontaneamente carcinomi ER+ metastatici e istologicamente eterogenei, con lunghi tempi di latenza; ciò rispecchia il legame epidemiologico tra l'esposizione alla PRL e i tumori ER+ aggressivi (36). Questi tumori possono svilupparsi in assenza di steroidi ovarici post-puberali, analogamente a quanto osservato nelle donne, dove l'aumento del rischio conferito dalla PRL è indipendente dagli estrogeni (16), sebbene la somministrazione supplementare di 17 β -estradiolo riduca la latenza tumorale (50). Una volta instauratisi, i tumori non dipendono più dagli estrogeni per la crescita, rappresentando un modello per i carcinomi luminali B clinicamente resistenti agli anti-estrogeni (53–55). Tuttavia, il recettore degli estrogeni (ER) rimane funzionale; l'attività estrogenica modula l'espressione genica e il comportamento tumorale, inclusi la proliferazione e l'attività delle cellule staminali tumorali (54, 56).

Al fine di comprendere gli eventi molecolari alla base dell'oncogenesi indotta dalla PRL, abbiamo condotto un'analisi genomica completa nel corso della malattia (57). Analogamente ai carcinomi mammari ER+ umani (58–60), i tumori allo stadio terminale presentavano un numero ridotto di mutazioni somatiche non sinonime. Tuttavia, quasi l'80% dei tumori presentava alterazioni nella via di segnalazione Ras, incluse mutazioni attivanti canoniche e amplificazioni del numero di copie di *Kras*. È interessante notare come molti carcinomi mammari clinici aggressivi ER+ mostrino un'elevata attività della via Ras, conseguenza di mutazioni nelle proteine Ras o di una ridotta espressione/perdita somatica dei geni oncosoppressori Ras-GAP (61–64). Gran parte del restante 20% dei tumori sperimentali indotti da PRL mostrava livelli elevati di pAKT, ma non di pERK1/2, un quadro compatibile con la presenza di mutazioni "driver" nella via della fosfatidilinositolo-3-chinasi, comuni in molti carcinomi clinici ER+ (63, 65, 66). Le analisi trascrittomiche hanno rivelato livelli variabili di espressione della PRL transgenica nei tumori rispetto al tessuto

preneoplastico, suggerendo un'influenza divergente della PRL una volta instauratisi i tumori. Tali analisi hanno inoltre rivelato marcate alterazioni nei processi intrinseci alle cellule e nel microambiente tumorale, inclusa l'attività immunitaria. In linea con la scarsa presenza di linfociti intratumorali (compresi i linfociti T effettori CD8+) e l'elevato numero di macrofagi infiltranti, i tumori presentavano livelli di trascritto notevolmente ridotti per molte chemochine e indicatori di immunità antitumorale. Questo ambiente immunosoppresso ricorda quello dei carcinomi mammari ER+ osservati in clinica [revisione in (67, 68)].

2.2.2 Azioni dirette sull'epitelio mammario

Approfonditi studi *in vitro* sugli effetti diretti della PRL sulle cellule di carcinoma mammario hanno dimostrato un aumento della proliferazione e del turnover cellulare [revisione in (22)]; tali effetti si osservano anche nell'epitelio mammario normale, all'interno del dinamico ambiente *in vivo* di diversi modelli murini (2, 45, 49). Inoltre, studi recenti hanno rivelato che la PRL esercita una forte influenza sulla gerarchia epiteliale mammaria, agendo sia indipendentemente dagli steroidi ovarici sia in sinergia con essi (69) (Figura 1).

Nel modello NRL-PRL, la PRL locale ha incrementato l'attività delle cellule staminali/progenitrici epiteliali e ha attenuato le reti regolatorie che guidano il differenziamento (69). In femmine giovani adulte ovariectomizzate, la PRL transgenica ha aumentato i progenitori luminali; in combinazione con estrogeni e progesterone, la PRL ha incrementato i progenitori bilineari e ha potenziato l'attività delle cellule staminali, associandola a una maggiore attivazione della via di segnalazione canonica Wnt. Tuttavia, la PRL ha contrastato la maturazione luminale indotta dagli steroidi, associandosi a livelli ridotti di trascritto Gata3 e livelli più elevati di Sox9 (69). Una letteratura sempre più ampia indica le popolazioni di cellule staminali/progenitrici come cellule di origine del tumore (70), e i progenitori luminali mammari sono stati identificati come precursori di diversi sottotipi di carcinoma mammario [revisione in (71)]. La capacità della PRL di espandere queste sottopopolazioni epiteliali potrebbe contribuire ad aumentare il rischio di insorgenza tumorale.

2.2.3 Effetti sulle cellule non epiteliali

È stato riportato che diverse cellule non epiteliali presenti nell'ambiente mammario esprimono il recettore della PRL (PRLR) (72, 73). Sebbene siano stati condotti pochi studi sperimentali sulle azioni della PRL a livello delle cellule stromali nel contesto del carcinoma mammario, i dati provenienti da condizioni fisiologiche e da altre patologie suggeriscono la necessità di ulteriori approfondimenti. Il ruolo cruciale del sistema immunitario nello sviluppo mammario, nella lattazione e nell'involutione è sempre più riconosciuto (74–76). La PRL, al pari degli steroidi ovarici, può influenzare la composizione e l'attività delle cellule immunitarie mammarie, sia indirettamente, alterando la secrezione di citochine da parte dell'epitelio (77), sia agendo direttamente sulle sottopopolazioni di cellule immunitarie innate e adattative (78–83). Studi sull'attivazione linfocitaria *in vitro* hanno evidenziato una risposta bimodale alla PRL, dipendente dalla concentrazione (84, 85), suggerendo l'interessante possibilità che la sintesi mammaria di PRL possa influenzare l'attività immunitaria locale. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che la PRL possa modulare l'infiammazione e/o l'immunotolleranza durante la tumorigenesi, contribuendo potenzialmente a creare un ambiente favorevole allo sviluppo del carcinoma mammario.

La sintesi di componenti della matrice extracellulare (ECM) indotta dalla PRL — sia nelle cellule bersaglio epiteliali che in quelle non epiteliali — può affiancarsi agli effetti mitogeni della PRL sull'epitelio mammario nell'aumentare la densità mammografica, suggerendo un ulteriore meccanismo attraverso il quale la PRL potrebbe accrescere il rischio (86). A tal proposito, è interessante notare la capacità della PRL di stimolare i macrofagi a incrementare la fibrosi nel carcinoma pancreatico (87). Inoltre, la PRL è in grado di modulare l'angiogenesi. Come proteina

integra, può promuovere la vascolarizzazione (88, 89); al contrario, i suoi prodotti di degradazione proteolitica (vasoinibine) inibiscono tale processo (90). Tali attività suggeriscono un ruolo sia nella normale funzionalità mammaria sia nel carcinoma mammario (91).

2.2.4 Contributo alla crescita delle lesioni precoci

Queste azioni della PRL sull'epitelio mammario e, potenzialmente, su altre cellule stromali potrebbero favorire lo sviluppo di carcinomi mammari. Inoltre, tali attività alimenterebbero le lesioni precoci indipendentemente dall'evento iniziale (Figura 1). Molte lesioni cliniche di carcinoma duttale *in situ* (DCIS) esprimono il recettore della PRL (PRLR) (92) e l'antagonista della PRL, $\Delta 1$ -9-G129R-hPRL, ha inibito la capacità di formare mammosfere in campioni primari di DCIS (93). L'ampia letteratura basata sull'aumento dei livelli sistemici di PRL mediante isoinnesti ipofisari in modelli murini dimostra che la PRL, in combinazione con il progesterone, può promuovere tumori indotti da agenti cancerogeni o dalla delezione del gene *p53* [es. (6, 94)]. Di contro, l'ablazione genetica della linea germinale di *Prl* o *Prlr* ha rallentato la crescita di lesioni indotte da oncogeni virali (95, 96). Gli antipsicotici che agiscono antagonizzando la dopamina, determinando così un aumento della PRL circolante, hanno favorito la tumorigenesi in modelli sperimentali indotti da RCAS-caErbB2, RCAS-HrasQ61L e MMTV-Wnt-1 (97). Un recente studio ha rilevato che i pazienti in trattamento con tali farmaci presentavano un rischio significativamente maggiore di cancro al seno (20). Nel loro insieme, queste osservazioni condotte su pazienti e modelli murini indicano un ruolo della PRL nella progressione delle lesioni precoci.

2.2.5 Interazione con altri fattori

2.2.5.1 Estrogeni e progesterone

Nei pazienti, la PRL agisce in sinergia con altri ormoni e fattori potenzialmente cancerogeni, oltre che nel contesto della disregolazione di molteplici vie di segnalazione man mano che la malattia progredisce. Prima della menopausa, la PRL interagisce con gli steroidi ovarici; dopo la menopausa, la terapia ormonale sostitutiva (TOS) combinata estrogeno-progestinica mantiene tale interazione reciproca. Nella coorte dello studio *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC), le donne in post-menopausa con livelli circolanti di PRL più elevati e che avevano fatto uso di TOS combinata estrogeno-progestinica hanno mostrato l'aumento più significativo dell'incidenza di carcinoma mammario ER+ (33). Anche gli estrogeni, in assenza di progestinici, svolgono un ruolo nelle donne in post-menopausa sottoposte a TOS a base di soli estrogeni o, nelle donne non trattate, attraverso la sintesi extra-ovarica di estrogeni (98, 99). La PRL interagisce sinergicamente con gli estrogeni – un noto fattore di rischio per il carcinoma mammario – attraverso molteplici meccanismi, tra cui la reciproca *up-regulation* dei rispettivi recettori (100, 101) e interazioni funzionali a valle delle vie di segnalazione (102, 103). La somministrazione supplementare di estrogeni accelera lo sviluppo di tumori mammari indotti dalla PRL nel modello NRL-PRL (50). Inoltre, la PRL induce la fosforilazione di AKT e ERK1/2 (pAKT e pERK1/2), in grado di attivare il recettore ER α anche in assenza del ligando estrogenico, sia *in vivo* che *in vitro* (104–106). L'interazione tra PRL e progesterone è stata studiata principalmente nel contesto della gravidanza e dell'allattamento: in queste fasi, i due ormoni cooperano per favorire l'espansione delle cellule alveolari durante la gravidanza, ma agiscono in modo antagonista per avviare l'allattamento (3). Al di fuori della gravidanza, essi regolano reciprocamente i rispettivi recettori e, come già osservato, cooperano per incrementare la popolazione di cellule staminali mammarie (69, 107, 108).

2.2.5.2 Altri fattori oncogeni

Livelli elevati di PRL transgenica a livello locale hanno inoltre evidenziato una forte sinergia con altre vie di segnalazione oncogene. Gli incroci tra topi NRL-PRL e altri modelli murini di carcinoma mammario – caratterizzati da elevati livelli di TGF α , perdita di p53 o segnali Wnt canonici potenziati da una mutazione inattivante nel soppressore tumorale APC – hanno ridotto drasticamente la latenza tumorale o aumentato l'incidenza dei tumori (52, 104, 109–111). La PRL transgenica non solo ha favorito la carcinogenesi, ma ha anche influenzato in modo marcato le caratteristiche dei tumori risultanti, con potenziali ripercussioni sulla risposta ai trattamenti. Ad esempio, la PRL locale transgenica ha aumentato la proporzione di tumori di sottotipo "claudin-low" in assenza di p53 (110); inoltre, in presenza di APC mutato, livelli elevati di PRL hanno dato origine a tumori caratterizzati da un'attività delle cellule staminali tumorali dipendente dalla via Notch, a differenza della dipendenza dalla β -catenina osservata nei tumori con sola mutazione di APC (111). Infine, la combinazione di PRL e TGF α transgenici ha sostenuto l'attivazione delle cascate di segnalazione ERK1/2 e AKT (104, 109), riflettendo la potente cooperazione tra la PRL e i segnali innescati dai fattori di crescita (112, 113). Ciò determina un'ulteriore attivazione di ER α *in vivo* anche in assenza del ligando estrogenico (104, 106, 109), un meccanismo alla base della resistenza dei carcinomi mammari ER+ agli anti-estrogeni (114, 115) (Sezione 3.3, *infra*). Al contrario delle interazioni positive tra PRL e fattori di crescita osservate in questi modelli murini transgenici e di carcinoma mammario, è stato riportato che PRL ed EGF esercitano effetti opposti in linee cellulari mammarie "normali", come HC11 e NMuMG; è probabile che il fenotipo della cellula bersaglio giochi un ruolo determinante nel definire l'esito dei segnali mediati dalla PRL e la loro interazione con altri segnali (112, 116).

3 Ruolo della PRL nei tumori mammari conclamati

A differenza dei solidi dati epidemiologici che supportano un ruolo della PRL nello sviluppo del tumore mammario, in particolare dei tumori ER+, il suo ruolo nei tumori già insorti è oggetto di un acceso dibattito. Gran parte della discussione verte sull'entità dell'espressione del PRLR nel parenchima tumorale – includendo i sottotipi di tumore mammario e le isoforme di PRLR coinvolte – e, aspetto fondamentale, sulla questione se la PRL alimenti l'aggressività tumorale o favorisca un fenotipo più differenziato.

3.1 Recettori della PRL nei tumori mammari clinici

Attraverso processi di splicing alternativo vengono generate isoforme di PRLR caratterizzate da domini intracellulari distinti e, di conseguenza, da diverse capacità di trasduzione del segnale. L'isoforma di PRLR "lunga" (a lunghezza intera) è la più studiata, ma, come indicato di seguito, è stata documentata anche l'espressione dell'isoforma "intermedia" nei tumori mammari. L'omo- ed etero-dimerizzazione di queste isoforme di PRLR influenza non solo il repertorio delle potenziali vie di segnalazione, ma anche la stabilità dei recettori stessi [revisione in (22, 117)]. Tali isoforme hanno ulteriormente complicato la rilevazione del PRLR nei vari sottotipi di tumore mammario, un'operazione già resa difficile dai limiti di specificità e sensibilità degli anticorpi storicamente disponibili (117, 118). Tuttavia, numerosi studi recenti hanno riportato l'espressione della proteina PRLR in tumori mammari ER+, HER2+ e tripli-negativi (TNBC), in netto contrasto con il legame epidemiologico esistente tra PRL e sviluppo esclusivo di tumori mammari ER+. La proporzione di tumori che esprimevano PRLR all'interno di ciascun sottotipo variava in base alla coorte esaminata, all'anticorpo utilizzato [ovvero anticorpi diretti contro il dominio extracellulare comune alla maggior parte delle isoforme di PRLR (119–121), contro il dominio intracellulare dell'isoforma "lunga" a lunghezza intera (92, 122) o contro il dominio intracellulare specifico dell'isoforma "intermedia" (117)] e ad altre differenze metodologiche. Alla luce di tali variabili, non sorprende che la percentuale di tumori mammari esprimenti PRLR sia risultata variabile tra il 25% e l'83%.

Sebbene l'espressione del PRLR fosse indipendente dallo stato del recettore degli estrogeni (ER) (92, 119, 120, 122), i livelli di PRLR risultavano più elevati nei tumori ER+ (92, 123). Alcuni di questi studi hanno rilevato la massima espressione di PRLR nei tumori più differenziati, in pazienti con una sopravvivenza libera da metastasi più lunga (92, 119). Per contro, Shemanko e colleghi hanno osservato che livelli più elevati della proteina PRLR nel tumore erano correlati a un tempo più breve per la comparsa di metastasi ossee, un dato coerente con la differenziazione degli osteoclasti indotta dalla PRL osservata in ambito sperimentale (120). Alcuni di questi lavori hanno analizzato l'abbondanza relativa dei trascritti e gli esiti clinici utilizzando vari database pubblici; pur tenendo presente che i livelli dei trascritti potrebbero non riflettere l'espressione proteica, anche tali risultati hanno mostrato discrepanze (92, 123).

Sebbene, nel complesso, i tumori mammari triplo-negativi (TNBC) esprimessero livelli inferiori di PRLR — rilevati mediante un anticorpo diretto contro il dominio intracellulare della forma "lunga" del recettore (92) — un sottogruppo di tali tumori presentava livelli più elevati di PRLR. È emerso che questo sottogruppo di TNBC era caratterizzato da un maggior grado di differenziazione, avvalorando l'ipotesi che la PRL promuova un programma di differenziazione in questi tumori (122) (si veda la revisione di Ali e colleghi in un altro articolo di questa serie). È interessante notare, tuttavia, che Clevenger e colleghi hanno segnalato come l'isoforma "intermedia" del PRLR — non rilevabile con l'anticorpo utilizzato nello studio citato in precedenza — fosse quella maggiormente espressa nei TNBC (117). Inoltre, analizzando il database TCGA, hanno riscontrato che i tumori caratterizzati da un elevato rapporto tra i trascritti dell'isoforma "intermedia" e quelli dell'isoforma "lunga" del PRLR erano associati a una maggiore probabilità di metastasi a distanza. A livello sperimentale, gli eterodimeri formati da queste isoforme del PRLR risultavano più stabili e meno capaci di attivare la via di segnalazione STAT5 (si veda la Sezione 3.4.2 più avanti). I TNBC clinici sono estremamente eterogenei (124, 125); nel loro insieme, questi studi suggeriscono che diversi sottogruppi di TNBC possano rispondere alla PRL in modo assai differente. Sebbene molti di questi studi abbiano messo in relazione i livelli della proteina o dei trascritti del PRLR con la prognosi — giungendo tuttavia a conclusioni contrastanti — gli effetti della segnalazione mediata dal PRLR sono stati valutati direttamente solo in studi preliminari (fase I/II) su pazienti con malattia in stadio avanzato. Uno studio condotto utilizzando un anticorpo neutralizzante il PRLR in monoterapia su 34 pazienti affette da carcinoma mammario (comprendente tutti i sottotipi, ma con il 75% di tumori ER+) non ha evidenziato alcun effetto significativo sulla progressione della malattia (126). In un altro studio di fase II su scala ridotta (20 pazienti con carcinoma mammario), è stata impiegata la cabergolina, un agonista del recettore D2 della dopamina, per inibire la secrezione ipofisaria di PRL; due delle pazienti trattate hanno ottenuto un controllo prolungato della malattia (127). L'assenza di risultati positivi definitivi ha ridotto l'entusiasmo, sebbene l'interpretazione dei dati sia limitata dall'esiguo numero di pazienti, dallo stadio avanzato della malattia e dai regimi di pretrattamento intensivi. Ciononostante, l'interesse per questo ambito di ricerca rimane vivo. Sono in fase di sviluppo coniugati che associano altri agenti terapeutici ad antagonisti della PRL o ad anticorpi neutralizzanti il PRLR, come descritto più approfonditamente nella successiva Sezione 3.3.

3.2 Studi sperimentali basati su xenotrapianti

La PRL murina mostra scarsa attività sul PRLR umano (30), fatto che ha complicato lo studio sperimentale dei tumori mammari *in vivo*. Tuttavia, Rui e colleghi hanno sviluppato un modello murino in cui il gene *Prl* del topo è stato sostituito con il gene *PRL* umano (NSG-Pro), ottenendo così una regolazione fisiologica dell'espressione di hPRL (128). In questi animali riceventi, gli xenotrapianti derivati da pazienti (PDX) ER-positivi hanno mostrato un tasso di attecchimento notevolmente superiore (di 15-20 volte) rispetto a quello osservato nei topi NOD SCID gamma

(NSG) *wild-type*. Inoltre, i topi NSG-Pro hanno favorito la disseminazione metastatica e la crescita di lesioni a distanza, nonché l'evoluzione genetica e lo sviluppo di resistenza agli anti-estrogeni (128). Tali studi avvalorano l'ipotesi di un ruolo importante della PRL nella biologia dei tumori ER-positivi.

Linee cellulari di carcinoma mammario ben caratterizzate, rappresentative di diversi sottotipi tumorali, sono state ampiamente studiate *in vitro* per comprendere gli effetti dell'azione della PRL e per analizzarne i segnali e i meccanismi di interazione con altri fattori; tali studi non verranno qui ulteriormente approfonditi (si vedano le revisioni di Ali, Clevenger e colleghi presenti in questa stessa serie). Alcuni ricercatori hanno esaminato le risposte alla PRL in modelli murini riceventi linee cellulari trapiantate, fornendo una fonte supplementare di hPRL, ma ottenendo risultati contrastanti. Nei topi *nu/nu* (nude), i tumori primari derivanti dal trapianto di cellule di carcinoma mammario MDA-MB-468 esprimenti hPRL sono cresciuti più rapidamente rispetto a quelli che non la esprimevano (129). La riduzione dell'isoforma "lunga" del PRLR ha diminuito il carico metastatico polmonare ed epatico in topi NOD-SCID riceventi cellule HER2-positive BT474 e trattati con hPRL (130). Per contro, il trattamento con hPRL di topi NOD/SCID portatori di xenotrapianti di cellule di carcinoma mammario MDA-MB-453 ha ridotto la crescita tumorale e la disseminazione (122), così come la crescita di tumori primari HER2-positivi SKBR3 (131). In un approccio diverso, Ali e colleghi hanno utilizzato CRISPR/Cas9 per ridurre l'espressione di PRLR nelle linee cellulari di carcinoma mammario MCF7 (ER+) e SKBR3 (HER2+) (132). La perdita di PRLR nelle cellule MCF7 ha ridotto l'espressione di ER – coerentemente con la regolazione di ESR1 da parte della PRL – e ha favorito lo sviluppo di tumori meno differenziati e più aggressivi in seguito al trapianto in topi NOD/SCID. Nelle cellule SKBR3 (HER2+), la perdita di PRLR ha aumentato l'espressione di HER2 e la capacità di colonizzare i polmoni di topi riceventi NSG. Tali risultati, unitamente alle analisi *in vitro* correlate, indicano un ruolo favorevole del PRLR in questi modelli (132). (Si veda la revisione di Ali e colleghi presente in un'altra parte di questa serie).

Le basi delle risposte divergenti alla PRL osservate in questi studi di xenotrapianto non sono chiare. Esistono molte differenze tra questi esperimenti. Le cellule tumorali trapiantate – siano esse PDX o diverse linee cellulari di carcinoma mammario (133, 134) – presentano caratteristiche assai distinte. Inoltre, il disegno sperimentale varia notevolmente, includendo la sede del trapianto cellulare, il grado di immunodeficienza degli ospiti murini e le modalità di modulazione dell'attività della PRL. Sono necessari ulteriori studi per comprendere in che modo tali risultati rispecchino la varietà clinica dei carcinomi mammari.

Sono stati condotti pochi studi su modelli sperimentali singenici; tuttavia, i risultati ottenuti sono interessanti. In un modello murino di tumore HER2+ (MMTV-neu), l'antagonista della PRL, G129R-hPRL, ha ridotto le metastasi dopo la rimozione del tumore primario (135). In uno studio successivo, è emerso che gli effetti di G129R-hPRL sulla segnalazione di HER2 in questo modello dipendevano dai fibroblasti associati al tumore (136), confermando l'importanza di studiare sistemi complessi caratterizzati da molteplici tipi cellulari. La riduzione sistemica dell'espressione dell'isoforma "lunga" del PRLR, ottenuta mediante un metodo innovativo, ha ridotto le metastasi nel modello aggressivo 4T1, individuando nelle cellule T regolatorie (Treg) immunosoppressive – sostenute dalla PRL – un bersaglio fondamentale (83, 130). Tali osservazioni mettono in luce i limiti dei modelli di xenotrapianto. Aspetto di particolare rilievo è che gli attuali modelli riceventi di xenotrapianto sono gravemente immunocompromessi, mancando di componenti fondamentali della risposta dell'ospite. Gli sforzi in corso per sviluppare topi dotati di sistema immunitario "umanizzato" ovvieranno a tale carenza. Inoltre, sottili differenze strutturali tra le proteine murine e quelle umane possono ostacolare la comunicazione paracrina o sistemica tra le cellule tumorali e quelle stromali; un esempio è rappresentato dalla stessa PRL (30).

3.3 Interazioni della PRL con altri approcci terapeutici

Sebbene gli inibitori della PRL/PRLR non abbiano mostrato risultati particolarmente promettenti come monoterapie, vi è un interesse di lunga data per la loro interazione con altre modalità di trattamento, in particolare con gli anti-estrogeni nei tumori mammari ER+. Come indicato nella Sezione 2.2.5, la PRL interagisce sinergicamente con gli estrogeni attraverso molteplici meccanismi, studiati principalmente nella linea cellulare di carcinoma mammario ER+ ben differenziata MCF7 (100–103). Non sorprende che, come accade per altri aspetti della biologia tumorale, tale relazione si modifichi con la progressione della malattia. In un modello sperimentale di ratto affetto da carcinoma mammario ER+ ormono-sensibile, l'inibizione concomitante di PRL e aromatasi ha ridotto la crescita tumorale in modo sinergico (137). Analogamente, in modelli PDX ER+ derivati da pazienti non precedentemente trattati (naive) e trapiantati in ospiti NSG-Pro, la PRL ha inizialmente favorito la risposta agli anti-estrogeni; tuttavia, col passare del tempo, l'ambiente ricco di PRL ha facilitato l'insorgenza di resistenza al tamoxifene (128). Tale fenomeno è risultato associato a un incremento dei segnali mediati dai fattori di crescita, inclusa l'attivazione del recettore degli estrogeni (ER) indipendente dal ligando — una conseguenza significativa del *crosstalk* tra PRL e fattori di crescita (vedi Sezione 2.2.5) — e all'attivazione della via di segnalazione ERBB2 (128). La relazione tra PRL e resistenza agli anti-estrogeni trova riscontro in alcuni, sebbene non tutti, i piccoli studi clinici condotti in materia [revisionati in (16)]. È interessante notare come LAT1/SLC7A5 — un trasportatore di aminoacidi a catena ramificata regolato dalla PRL durante l'allattamento (138) — risulti altamente espresso nei tumori resistenti al tamoxifene (139–141). Il crescente riconoscimento dell'importanza del metabolismo tumorale, unitamente al ruolo della PRL nella regolazione metabolica durante l'allattamento, suggerisce che questo ambito meriti ulteriori approfondimenti.

L'intensa interazione (*crosstalk*) tra la PRL e i segnali attivati dai fattori di crescita, osservata sia nelle linee cellulari di carcinoma mammario (112, 142) sia nei modelli PDX ER+ resistenti agli anti-estrogeni (128), ha suggerito che colpire la via di segnalazione della PRL in combinazione con tali percorsi di segnalazione potrebbe rappresentare una strategia terapeutica efficace. La PRL è in grado di indurre la fosforilazione di HER2 nelle cellule di carcinoma mammario SKBR3 e BT474 *in vitro* e in un tumore murino derivato da MMTV-neu *ex vivo* (136, 143, 144). Alla luce dell'apparente discrepanza tra queste osservazioni *in vitro* e i risultati di alcuni (ma non tutti) gli studi su xenotrapianti, come evidenziato nella Sezione 3.2, tale aspetto merita ulteriori approfondimenti.

Diversi studi clinici di piccole dimensioni hanno suggerito che la riduzione dei livelli di PRL potrebbe migliorare la risposta alla chemioterapia [revisione in (16, 145)]. La capacità della PRL di favorire la sopravvivenza delle cellule di carcinoma mammario *in vitro* è nota da tempo [revisione in (22, 145)]. In linee cellulari di carcinoma mammario rappresentative di diversi sottotipi tumorali, la PRL ha promosso la resistenza a chemioterapici quali doxorubicina, paclitaxel e cisplatino (93, 146, 147). Sono stati identificati diversi meccanismi correlati, tra cui l'espressione indotta dalla PRL di proteine anti-apoptotiche (148), la trascrizione del trasportatore ABCG2 associato alla multiresistenza ai farmaci (149) e l'attivazione della glutatione-S-transferasi (147). Sebbene l'interazione con i trattamenti chemioterapici non sia stata ulteriormente indagata in ambito clinico, tali effetti potrebbero contribuire all'efficacia di composti coniugati ad agenti anti-PRL, come descritto di seguito.

La tossicità relativamente bassa degli antagonisti della PRL e degli anticorpi neutralizzanti il PRLR, unitamente alla diffusa espressione del PRLR nei diversi sottotipi di carcinoma mammario, ne ha stimolato lo sviluppo come veicoli di trasporto per altri agenti terapeutici, inclusi composti citotossici (121, 135, 150, 151), agenti anti-HER2 (152) e immunomodulatori volti a reclutare e/o attivare linfociti T CD8+ (135, 153). Oltre a consentire il rilascio mirato di altri trattamenti, la

sperimentazione di queste molecole fornirà informazioni anche sull'efficacia dell'inibizione concomitante dei segnali mediati dalla PRL.

3.4 Segnali attivati dalla PRL.

3.4.1 Via canonica JAK2-STAT5

Come descritto in precedenza, la maggior parte degli studi ha esaminato l'esito complessivo di tutti i segnali attivati dalla PRL in diversi contesti di carcinoma mammario. Tuttavia, è noto da tempo che la PRL può attivare molteplici cascate di segnalazione (22, 51), con esiti potenzialmente differenti. La via JAK2-STAT5A media la proliferazione e il differenziamento indotti dalla PRL, processi essenziali per una lattazione efficace (2, 154, 155); inoltre, il legame di STAT5A a regioni regolatorie di tipo *enhancer* avvia il rimodellamento della cromatina, coordinando l'espressione genica tessuto-specifica (4, 156) (si veda la rassegna di Clevenger e colleghi in un altro contributo di questa serie). La sovraespressione transgenica di STAT5A porta allo sviluppo di carcinomi mammari anche in assenza di altri oncogeni (46). Tuttavia, nei carcinomi mammari clinici, un'elevata attività di STAT5A è stata ripetutamente associata a tumori più differenziati e a una prognosi migliore [(154, 157, 158) e riferimenti ivi citati]. Coerentemente, la via JAK2-STAT5A è stata anche collegata agli effetti pro-differenziativi indotti dalla PRL in vari modelli sperimentali (53, 56, 159–161) (Figura 2). Di particolare interesse per il carcinoma mammario in pre-menopausa è il fatto che la STAT5 attivata dalla PRL abbia inibito una popolazione di cellule progenitrici indotta dai progestinici nelle cellule di carcinoma mammario T47D (162).

La proteina STAT5B, altamente omologa a STAT5A, rappresenta un elemento di complessità in questi studi. A differenza *in vitro*, di STAT5A, STAT5B non è associata a una prognosi più favorevole nei pazienti (158) e, promuove un comportamento aggressivo in diversi modelli (56, 159, 161). Le sue attività, distinte da quelle di STAT5A, sono sostenute da geni bersaglio differenti (56, 158, 163) e da una regolazione divergente mediata dagli estrogeni (56). Sono necessari ulteriori studi, condotti con reagenti più specifici, per chiarire i ruoli delle isoforme di STAT5 nell'ambito delle azioni della PRL nel carcinoma mammario.

3.4.2 Altre cascate di segnalazione

La PRL può inoltre innescare l'attivazione delle chinasi della famiglia Src e di numerosi altri mediatori, tra cui AKT e le MAP chinasi (164–168). È interessante notare come le isoforme del PRLR generate da splicing alternativo, caratterizzate da domini intracellulari distinti, mostrino una minore capacità di attivare la via JAK2/STAT5 rispetto alla ben nota isoforma "lunga" del PRLR. Infatti, l'eterodimerizzazione dell'isoforma "lunga" del PRLR con l'isoforma "intermedia" — la cui elevata espressione è stata recentemente segnalata in un sottogruppo di tumori mammari tripli negativi (TNBC; cfr. Sezione 3.1) — inibisce la fosforilazione di STAT5, senza tuttavia interferire con le altre vie di segnalazione attivate dalla PRL (117). Le cascate di AKT e MAP chinasi sono associate alla progressione tumorale in molte neoplasie (169–173). Inoltre, come già accennato, tali vie possono attivare ER α in assenza di ligando (105, 106), con ripercussioni sulla risposta terapeutica agli anti-estrogeni nei carcinomi mammari ER-positivi. È importante sottolineare che esse rappresentano anche siti cruciali di cooperazione con altri fattori oncogenici, inclusi i fattori di crescita (112, 142). Nel loro insieme, queste osservazioni evidenziano i potenziali esiti divergenti delle diverse branche della segnalazione della PRL e sollevano interrogativi sui fattori che determinano il repertorio di vie di segnalazione attivabili dalla PRL. È evidente che un ruolo determinante è svolto dalle differenze intrinseche delle cellule tumorali stesse, compresi i livelli relativi delle isoforme del PRLR e degli altri componenti della segnalazione; Diverse linee cellulari di carcinoma mammario, anche appartenenti allo stesso sottotipo, mostrano spettri differenti di

segnali attivati dalla PRL *in vitro*, [ad es. (137, 174)]. Inoltre, come discusso di seguito, anche i fattori ambientali possono modulare in modo significativo l'equilibrio dei segnali mediati dalla PRL.

3.4.3 Le caratteristiche della matrice extracellulare modificano i segnali avviati dalla PRL nelle cellule tumorali ER+ e alterano la sensibilità agli anti-estrogeni

Una crescente mole di dati sottolinea l'importanza della matrice extracellulare (ECM) nella normale funzione mammaria e nel comportamento tumorale (86, 175). Una matrice meccanicamente rigida incrementa la segnalazione attraverso le adesioni focali (176, 177). Fibre di collagene allineate e orientate perpendicolarmente al confine del tumore sono state associate a una prognosi sfavorevole, in particolare nel carcinoma mammario ER+ (178). Abbiamo dimostrato che la struttura della ECM può influenzare fortemente lo spettro dei segnali della PRL e il *crosstalk* tra PRL ed estrogeni nelle cellule di carcinoma mammario ER+ e, viceversa, che tali ormoni possono modificare la struttura della ECM (Figura 2). Quando linee cellulari di carcinoma mammario ER+ ben caratterizzate (cellule MCF7 e T47D) venivano coltivate *in vitro*, su ECM rigida (colture tridimensionali di collagene e substrati in poliacrilammide a rigidità modulabile), la PRL mostrava una ridotta capacità di attivare la via JAK2/STAT5, ma attivava più intensamente la via FAK-SRC-ERK1/2, associata a una maggiore localizzazione del recettore della PRL (PRLR) a livello delle adesioni focali (167, 179). Tali condizioni favorivano l'invasione indotta dalla PRL e il riorientamento delle fibre di collagene *in vitro*, (167), nonché l'intravasazione e la metastatizzazione di tumori ER+ guidati dalla PRL in un modello singenico caratterizzato da aumentata densità/rigidità di COL1A1 *in vivo* (180). Inoltre, una matrice rigida/densa potenziava il *crosstalk* tra PRL ed estrogeni, incrementando l'invasività, riducendo la risposta al tamoxifene e modificando ulteriormente la struttura della ECM *in vitro* (181); tali risultati sono stati confermati utilizzando il modello singenico ER+ sopra citato (55). Infine, il progesterone potenziava ulteriormente l'induzione dell'RNA di MMP3 da parte della PRL in matrici rigide (107). Tali studi indicano che la desmoplasia, una caratteristica del microambiente di molti tumori, può alterare il repertorio di segnali attivati dalla PRL favorendo vie pro-tumorali e la resistenza agli anti-estrogeni; ciò chiarisce un meccanismo alla base delle evidenze apparentemente discordanti sugli effetti della segnalazione della PRL nei carcinomi mammari ER+. L'estensione di queste ricerche – incentrate sull'influenza delle caratteristiche della matrice extracellulare (ECM) sulla segnalazione della PRL – ad altri sottotipi di carcinoma mammario potrebbe contribuire ulteriormente a risolvere alcune delle discrepanze apparentemente contraddittorie riscontrate in letteratura.

4 Riepilogo e direzioni future

Forti dati epidemiologici che collegano livelli più elevati di PRL circolante a un aumento del rischio di cancro al seno ER+ sono supportati da molteplici linee di evidenza sperimentale. Indipendentemente dagli steroidi ovarici, la PRL può modulare la gerarchia epiteliale e aumentare le popolazioni di progenitori, guidare lo sviluppo di anomalie duttali e alveolari e, con il tempo, promuovere carcinomi ER+ metastatici aggressivi. La PRL si impegna in complesse interazioni con estrogeni e progesterone, cooperando con loro attraverso molteplici meccanismi, ma opponendosi anche alla differenziazione guidata dagli steroidi. Una maggiore comprensione di queste interazioni, a parte l'ambiente ormonale della gravidanza, fornirà ulteriori informazioni sull'impatto della PRL sull'aumento del rischio di cancro al seno nelle donne in premenopausa e in quelle in postmenopausa trattate con estrogeno-progesterone MHT (Menopausal Hormon Therapy) (107, 162, 182). Man mano che la malattia progredisce con la disregolazione di molteplici percorsi, è probabile che le proprietà intrinseche delle cellule tumorali e l'ambiente stromale alterino le risposte delle cellule bersaglio alla PRL e le sue interazioni con altri potenziali fattori oncogeni. Sebbene

non ben compresa, la letteratura suggerisce che la PRL può anche agire direttamente su più tipi di cellule stromali mammarie, comprese le sottopopolazioni di cellule immunitarie, e/o modulare la loro attività tramite segnali paracrini, il che può aumentare ulteriormente il rischio. L'elevata espressione di PRLR nei DCIS clinici e nelle strutture preneoplastiche nei modelli preclinici ricorda l'espressione di ER in molte di queste lesioni [riviste in (183)] e suggerisce un ruolo per la PRL in questa fase iniziale del processo patologico.

Al contrario, il ruolo della PRL nella biologia dei tumori al seno clinici accertati rimane poco chiaro. Sebbene il PRLR sia altamente espresso da molti tumori di tutti i sottotipi di cancro al seno, i dati provenienti da piccoli studi clinici che inibiscono l'azione del PRL sono difficili da interpretare e gli studi sugli xenotrapianti, in particolare sulle linee cellulari di cancro al seno, sono contrastanti. Le risposte di tumori eterogenei fenotipicamente diversi sono complicate da diversi livelli di isoforme PRLR con capacità di segnalazione distinte, selezione ed evoluzione genomica man mano che i tumori progrediscono e rispondono alle terapie iniziali e al contesto ambientale, comprese le risposte specifiche del sito della nicchia metastatica [ad esempio, osso (120)], proprietà dell'ECM e ambiente dell'ormone steroideo e del fattore di crescita (Figura 3). I dati emergenti supportano azioni complesse della PRL nella biologia del cancro al seno, somigliando al principale attore ormonale riconosciuto nel cancro al seno, gli estrogeni (184-186). Ciò è illustrato nei tumori ER+, il sottotipo di cancro al seno in cui le azioni della PRL sono attualmente meglio comprese. Prove sperimentali mostrano che la PRL può attivare la differenziazione guidata da STAT5A e mantenere l'espressione di ER α , facilitando così la reattività anti-estrogena (56, 128, 132, 159, 161). Tuttavia, la PRL può anche favorire la proliferazione e l'invasione e supportare lo sviluppo della resistenza agli antiestrogeni (128, 181). All'interno dei TNBC eterogenei, l'evidenza indica sottogruppi distinti che mostrano risposte divergenti alla PRL (117, 122). Risultati contrastanti in un numero molto limitato di diverse linee cellulari di cancro al seno HER2+ suggeriscono possibilità simili. Insieme, questi rapporti dipingono un quadro più sfumato dell'azione della PRL nei tumori accertati e del potenziale di risultati molto diversi a seconda del contesto. Sottolineano la necessità di ulteriori studi sulla PRL in diversi tumori al seno clinici, sui cambiamenti con la progressione della malattia e sulla pressione terapeutica e sulle influenze dei siti metastatici.

Nuove tecnologie contribuiranno a risolvere queste problematiche. Il modello murino NSG-Pro rappresenta uno strumento potente per indagare l'attività della PRL in diversi tumori mammari di rilevanza clinica all'interno di un ambiente dinamico *in vivo* (128). Oltre a fornire informazioni sui tumori ER+, questo modello aiuterà a chiarire le discrepanze emerse in studi precedenti basati su xenotrapianti sperimentali di un numero limitato di linee cellulari di carcinoma mammario appartenenti ad altri sottotipi. Esso consentirà di analizzare i meccanismi alla base delle differenze osservate e faciliterà l'identificazione di biomarcatori predittivi di risposte favorevoli o avverse alla PRL e/o agli inibitori della PRL. In attesa della validazione dei modelli murini umanizzati, i modelli murini singenici rimangono fondamentali per svelare l'impatto della PRL – così come di altri agenti – sull'infiammazione e sulla soppressione dell'immunità antitumorale; si tratta di un passaggio cruciale per sfruttare appieno il potenziale delle immunoterapie nei tumori ormono-sensibili. Inoltre, come discusso nella Sezione 2.2.3, numerosi altri tipi cellulari stromali che plasmano il microambiente tumorale costituiscono potenziali bersagli della PRL, giustificando ulteriori ricerche in questo ambito. La carenza di inibitori per studiare l'attività della PRL in campioni clinici e modelli sperimentali viene oggi superata grazie all'impiego di inibitori a piccola molecola (129), di tecnologie per ridurre specifiche isoforme del PRLR *in vivo* (130) e di un rinnovato interesse per gli anticorpi neutralizzanti il PRLR (Sezioni 3.1, 3.3). Lo sviluppo di inibitori selettivi dei segnali della PRL mediati dalle chinasi della famiglia JAK2 e Src – sfruttando le conoscenze acquisite sul recettore dell'ormone della crescita (GH), strettamente correlato – darà ulteriore impulso a questi studi (142, 187, 188). Nel loro insieme, questi approcci permetteranno di decifrare le complesse

azioni della PRL, offrendo una nuova comprensione del ruolo di questo terzo ormone nel carcinoma mammario, con importanti implicazioni per la prevenzione e il trattamento.