

Titolo: La terapia antiestrogenica aumenta la plasticità e la staminalità tumorale dei carcinomi mammari ERα+ indotti dalla prolattina - Antiestrogen Therapy Increases Plasticity and Cancer Stemness of Prolactin-Induced ERα⁺ Mammary Carcinomas

Codice: PRL017

Autore: Shea et al.

Data: 2018

Rivista: *Cancer Research* (2018) 78 (7): 1672–1684

Argomento: prolattina

Accesso libero: sì

DOI/URL: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0985>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2026/10/06/prl017-shea-et-al-2018/>

PANORAMICA VIDEO (IA): <https://youtu.be/SIrOVe0hvD8>

Parole chiave: cancro al seno, sottotipo luminale B, terapia anti-estrogenica, cellule staminali tumorali, eterogeneità di lignaggio, fulvestrant, tamoxifene, prolattina

Tumore: carcinoma mammario

Traduzione: semplificata

Punti di interesse:

Razionale e modello sperimentale

Sebbene le terapie antiestrogeniche abbiano successo in molte pazienti con tumore al seno ERα+, circa il 25-40% dei casi non risponde o sviluppa resistenza. La scarsità di modelli preclinici ERα+ in vivo ha limitato lo studio dei meccanismi adattativi e delle cellule staminali tumorali (CSC). L'obiettivo dello studio era quello di comprendere perché una percentuale significativa di pazienti con tumore al seno recettore-positivo non risponda o sviluppi resistenza alla terapia endocrina/antiestrogenica, e indagare il ruolo della prolattina (PRL) e delle cellule staminali tumorali (CSC) in questo fenomeno.

Lo studio impiega il modello murino *NRL-PRL*, in cui l'elevata esposizione locale alla prolattina induce adenocarcinomi mammari aggressivi ERα+. Questo modello riproduce un sottogruppo di tumori umani caratterizzati da crescita indipendente dall'estrogeno, bassa espressione del recettore del progesterone (PR) e spiccata eterogeneità cellulare. Questo modello ha permesso di isolare gli effetti del blocco recettoriale sulla plasticità e sulla staminalità cellulare, senza la distorsione causata dalla riduzione della massa tumorale o dalla morte cellulare.

Eterogeneità cellulare e distribuzione delle cellule staminali tumorali (CSC)

I tumori indotti da prolattina sono composti da due popolazioni epiteliali stabili: una frazione luminale, caratterizzata dalla citocheratina K8 e una frazione basale caratterizzata dalla citocheratina K5. Diversamente dal tessuto mammario sano (in cui le cellule staminali risiedono unicamente nel comparto basale), nei tumori di questo modello la frequenza delle CSC è equamente distribuita tra la popolazione luminale e quella basale. L'iniezione di cellule purificate di una sola frazione rigenera tumori secondari con la medesima architettura ed eterogeneità del tumore originario.

Risposta adattativa al trattamento con fulvestrant in vivo

La somministrazione di fulvestrant nei topi con tumori stabiliti non riduce il volume tumorale, la proliferazione cellulare (Ki67) o l'apoptosi.

A 2 giorni dall'inizio del trattamento con fulvestrant, si osserva una riduzione temporanea superiore al 50% della popolazione basale, un calo della formazione di tumorosfere e una *soppressione* della segnalazione Wnt canonica (*Wnt4*, *Axin2*).

A 14 giorni di trattamento continuativo con fulvestrant, l'eterogeneità di lignaggio e la frequenza di CSC si ripristinano completamente, accompagnate da un incremento di 2-3 volte delle cellule plastiche doppio-positive K8+/K5+. Il tumore compensa l'inibizione: l'eterogeneità di lignaggio viene ripristinata e l'attività delle CSC viene recuperata o incrementata.

Questo recupero è guidato dalla riattivazione della via Wnt (*Axin2*), da un forte incremento della via Notch (aumento di 10 volte di *Hes1*) e dall'aumento dei marcatori di staminalità e transizione epitelio-mesenchimale (*Sox2*, *Bmi1* e *Twist1*).

Effetti diretti del fulvestrant e del tamoxifene in vitro e interazione tra vie molecolari

Negli esperimenti su tumorosfere in vitro, il trattamento primario con fulvestrant o con tamoxifene non modifica la formazione o la dimensione delle tumorosfere primarie. Tuttavia, sia il fulvestrant che il tamoxifene stimolano significativamente l'autorinnovamento delle CSC nella generazione secondaria e aumentano la proporzione di cellule doppio-positive K8+/K5+. Meccanicamente, il fulvestrant riesce a superare l'inibizione singola della via Wnt (tramite iCRT14) o della via Notch (tramite GSI). Solo la blocco simultaneo delle vie Wnt e Notch impedisce al fulvestrant di stimolare l'autorinnovamento cellulare, dimostrando la loro azione vicariante e complementare. L'effetto è soppresso anche dall'inibitore epigenetico delle deacetilasi istoniche tricostatina A (TSA).

Implicazioni cliniche

Nei tumori ERα+ caratterizzati da eterogeneità di lignaggio e crescita estrogeno-indipendente, le terapie endocrina con fulvestrant o tamoxifene possono non arrestare la crescita della massa e rischiano di stimolare la plasticità cellulare e l'autorinnovamento delle cellule staminali tumorali.

Questa risposta adattativa, sostenuta dalla cooperazione tra le vie Wnt e Notch, rappresenta un potenziale meccanismo molecolare con cui il trattamento ormonale può favorire la resistenza terapeutica e le recidive. **La promozione della staminalità e della plasticità tumorale rappresenta una conseguenza diretta del blocco della segnalazione degli estrogeni mediata da ERα, indipendentemente dalla specifica classe di antiestrogeno impiegata.**

RUOLO CHIAVE DI PROLATTINA, FULVESTRANT E TAMOXIFENE EMERSI DALLO STUDIO

Prolattina

La prolattina è un ormone proteico tradizionalmente noto per il suo ruolo nello sviluppo della ghiandola mammaria e nella produzione di latte. Elevati livelli di prolattina nel sangue sono stati epidemiologicamente associati a un maggior rischio di sviluppare tumori al seno metastatici recettore-estrogenico positivi (ERα+) nelle donne in post-menopausa.

Ruolo nello studio: I ricercatori utilizzano il modello murino transgenico NRL-PRL, nel quale l'espressione locale e continua di prolattina nella ghiandola mammaria induce spontaneamente adenocarcinomi mammari ERα+ aggressivi. Questo modello riproduce una sottoclasse di tumori al seno umani caratterizzati da spiccata eterogeneità cellulare, crescita indipendente dagli estrogeni e

bassa espressione dei recettori del progesterone (PR). Ciò ha permesso agli autori di studiare l'effetto dei farmaci antiestrogenici sulle cellule staminali tumorali e sulla plasticità cellulare in modo indipendente da variazioni del volume della massa tumorale.

Fulvestrant

Il fulvestrant (indicato nello studio con la sigla di laboratorio ICI 182,780) è un farmaco antiestrogenico appartenente alla classe dei degradatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERD).

Ruolo nello studio: Lo studio evidenzia che la somministrazione di fulvestrant non riduce il volume del tumore né la proliferazione cellulare nel modello NRL-PRL. Tuttavia, il farmaco innesca un'importante riorganizzazione cellulare: dopo un'iniziale e temporanea riduzione delle cellule basali e dell'attività delle cellule staminali tumorali (CSC) a 2 giorni dal trattamento, il proseguimento della terapia a 14 giorni porta al completo ripristino delle CSC. Questo recupero è accompagnato dall'aumento di cellule plastiche doppio-positive (K8+/K5+), dall'attivazione combinata delle vie molecolari Wnt e Notch e dall'aumento di marcatori legati alla staminalità e alla transizione epitelio-mesenchimale. Negli esperimenti *in vitro*, il fulvestrant stimola direttamente l'autorinnovamento delle CSC.

Tamoxifene

Il tamoxifene è un farmaco ormonale ampiamente utilizzato nella pratica clinica oncologica, appartenente alla classe dei modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERM).

Ruolo nello studio: Gli autori hanno valutato il tamoxifene negli esperimenti *in vitro* sulle tumorosfere per comprendere se l'aumento delle cellule staminali fosse una peculiarità del fulvestrant o un effetto comune all'inibizione del recettore ER α . I dati mostrano che anche il tamoxifene stimola significativamente la formazione di tumorosfere secondarie e l'autorinnovamento delle CSC. Questo dimostra che la promozione della staminalità e della plasticità tumorale rappresenta una conseguenza diretta del blocco della segnalazione degli estrogeni mediata da ER α , indipendentemente dalla specifica classe di antiestrogeno impiegata.

Traduzione articolo

Riassunto

Sebbene le terapie anti-estrogeniche siano efficaci in molte pazienti affette da carcinoma mammario ER α -positivo (ER α +), una percentuale compresa tra il 25% e il 40% non risponde al trattamento. Nonostante alla base della resistenza a queste terapie vi siano molteplici meccanismi – tra cui l'eterogeneità tumorale e la presenza di cellule staminali tumorali (CSC) resistenti ai farmaci – ulteriori approfondimenti sono stati limitati dalla scarsità di modelli preclinici di tumore ER α +. In questo studio, abbiamo esaminato un modello murino di carcinoma mammario ER α + aggressivo indotto dalla prolattina, che riproduce il legame epidemiologico tra l'esposizione alla prolattina e un aumentato rischio di tumori ER α + metastatici. Analogamente a quanto osservato in un sottogruppo di tumori ER α + nelle pazienti, gli adenocarcinomi indotti dalla prolattina presentavano due principali sottopopolazioni tumorali esprimenti marcatori tipici delle cellule epiteliali normali di tipo luminale e basale. L'attività delle CSC risultava equamente distribuita tra queste due sottopopolazioni. Il trattamento con ICI 182,780 (ICI), un agente selettivo di degradazione del recettore degli estrogeni (SERD), non ha rallentato la crescita tumorale, ma ha indotto risposte adattative nell'attività delle CSC, ha aumentato i marcatori di plasticità (inclusi geni reporter bersaglio delle vie di segnalazione Wnt/Notch e della transizione epitelio-

mesenchimale) e ha incrementato la popolazione di cellule a doppia positività (K8/K5). Nelle colture primarie di "tumorsfere", l'ICI ha stimolato l'auto-rinnovamento delle CSC ed è stato in grado di superare la dipendenza di tale processo dalle vie di segnalazione Wnt o Notch prese singolarmente, ma non quando entrambe erano attive contemporaneamente. I nostri risultati dimostrano che il trattamento con un SERD di carcinomi mammari ER α + aggressivi a lineage misto non ne inibisce la crescita; al contrario, esso stimola la plasticità delle cellule tumorali e l'attività rigenerativa delle CSC, suggerendo un probabile impatto negativo sui tumori delle pazienti che presentano tali caratteristiche.

Significato: Questo studio suggerisce che il trattamento di un sottogruppo di carcinomi mammari ER α + con terapie anti-estrogeniche potrebbe non solo fallire nel rallentare la crescita tumorale, ma anche favorire un comportamento aggressivo, inducendo plasticità nelle cellule tumorali e attività rigenerativa delle CSC.

Introduzione

La maggior parte dei carcinomi mammari clinicamente rilevanti esprime il recettore degli estrogeni alfa (ER α). Gli estrogeni rappresentano il principale fattore mitogenico per la maggior parte di questi tumori e le terapie adiuvanti anti-estrogeniche risultano efficaci in molte pazienti. Tuttavia, una quota significativa di queste donne manifesta inizialmente, o sviluppa successivamente, resistenza a tali trattamenti, rischiando di soccombere alla malattia metastatica (1, 2). Sebbene ricerche approfondite stiano chiarendo le cause di questa crescita insensibile agli estrogeni, si sa ancora poco sulle conseguenze dell'inibizione dell'attività estrogenica per altri aspetti del fenotipo tumorale che possono influenzare il comportamento e l'esito della malattia, come l'eterogeneità tumorale e l'attività di cellule neoplastiche dotate di caratteristiche staminali.

L'eterogeneità intratumorale è sempre più riconosciuta come un fattore chiave nella progressione tumorale e nella resistenza alle terapie (3–5). Una componente della diversità nei carcinomi mammari è rappresentata dal lignaggio epiteliale. Molti tumori clinicamente rilevanti contengono sottopopolazioni cellulari con caratteristiche simili a quelle delle cellule epiteliali mammarie normali, sia luminali che basali, distinguibili in base ai profili di espressione di citocheratine e proteine di superficie. Sebbene le cellule tumorali in molti carcinomi ER α + mostrino caratteristiche tipiche delle cellule luminali normali ed esprimano prevalentemente KRT8 (K8), in alcuni di questi tumori si riscontrano cellule che esprimono citocheratine associate alle cellule basali (ad es. KRT5 o K5); tale presenza è stata correlata a esiti clinici peggiori e a una maggiore frequenza di cellule con caratteristiche staminali (6–8). Le relazioni tra queste sottopopolazioni tumorali non sono ancora del tutto chiarite. Nella ghiandola mammaria normale, il modello gerarchico ipotizza che le cellule staminali, residenti nel compartimento basale, possano differenziarsi in entrambi i lignaggi epiteliali, luminale e basale (9). Analogamente, le cellule staminali tumorali (CSC) – note anche come cellule inizianti il tumore o cellule *cancer stem-like* – sono definite come cellule capaci di rigenerare tumori che riproducono l'eterogeneità della neoplasia originale (10, 11). Una letteratura sempre più vasta suggerisce che le CSC resistono a molti degli attuali approcci terapeutici, contribuendo così alla recidiva della malattia (5). Di conseguenza, comprendere in che modo le terapie mirate al recettore ER influenzino l'eterogeneità cellulare e le CSC nei carcinomi mammari ER α + riveste un notevole interesse.

Gli ormoni ovarici sono regolatori fondamentali delle sottopopolazioni epiteliali mammarie. Sebbene l'estrogeno di per sé non aumenti l'attività delle cellule progenitrici/staminali, esso incrementa l'espressione dei recettori del progesterone (PR), i quali mediano l'espansione della popolazione di cellule staminali (12, 13). L'effetto dei segnali estrogenici sull'attività delle CSC (cellule staminali tumorali) nei tumori è meno chiaro; è stato riportato che sia il 17 β -estradiolo (E2) sia gli antagonisti clinici dei recettori degli estrogeni (ER) aumentano l'attività delle CSC in vitro

(14, 15). Tuttavia, l'interpretazione di tali studi è resa complessa dalle differenze nella provenienza delle cellule tumorali, nei metodi di trattamento e nei saggi utilizzati per valutare tale attività (14, 15). La scarsità di modelli preclinici ER α ⁺ ha limitato la portata degli studi in vivo. Gli xenotrapianti di alcune linee cellulari di carcinoma mammario hanno costituito il pilastro di questa ricerca, che si sta ora estendendo a un numero ridotto di xenotrapianti derivati da pazienti (PDX) ER α ⁺. L'analisi degli effetti di estrogeni e antiestrogeni sull'attività delle CSC in molti di questi sistemi è ulteriormente complicata dall'azione che tali agenti esercitano sulla proliferazione e sulla sopravvivenza dei tumori sensibili agli estrogeni.

Lo studio approfondito delle relazioni dinamiche tra l'epitelio tumorale e l'attività delle CSC, nonché delle loro risposte alla terapia antiestrogenica, richiede l'impiego di modelli in vivo. Modelli in vivo robusti di malattia ER α ⁺, in particolare quelli dotati di un sistema immunitario integro, sono rari (16, 17). Livelli elevati di prolattina (PRL) circolante sono associati a un maggior rischio di sviluppare carcinoma mammario metastatico ER α ⁺ nelle donne in post-menopausa (18, 19), e studi di dimensioni più ridotte hanno collegato una maggiore attività della PRL alla resistenza terapeutica (20). Il topo transgenico NRL-PRL riproduce il profilo di espressione della PRL osservato nelle ghiandole mammarie umane (21). Le femmine NRL-PRL nullipare sviluppano spontaneamente carcinomi mammari aggressivi con un'elevata incidenza. Molti di questi tumori esprimono ER α e condividono caratteristiche con i carcinomi mammari umani ER α ⁺ del sottotipo Luminal B, tra cui una bassa espressione di PR e alti tassi di proliferazione indipendente dagli estrogeni (1, 22, 23). Tali caratteristiche consentono di esaminare gli effetti dell'attività estrogenica indipendentemente dalle alterazioni della crescita tumorale.

In questo studio, abbiamo utilizzato il modello murino NRL-PRL per indagare gli effetti del ICI 182,780 (ICI) – un agente in grado di indurre la down-regulation selettiva dei recettori degli estrogeni (SERD) – sull'eterogeneità di lignaggio e sulle cellule staminali tumorali (CSC) nei tumori ER α ⁺. Analogamente a un sottogruppo di tumori ER α ⁺ umani, gli adenocarcinomi ER α ⁺ indotti da PRL risultavano composti da due principali sottopopolazioni epiteliali, esprimenti marcatori tipici delle cellule luminali e basali normali. Tali sottopopolazioni mostravano attività CSC con frequenze simili. Il trattamento con ICI non ha rallentato la crescita tumorale, ma ha alterato transitoriamente la diversità di lignaggio riducendo la proporzione di cellule epiteliali con caratteristiche basali e ha diminuito l'attività CSC. Tuttavia, con la prosecuzione del trattamento, l'eterogeneità è stata ripristinata, associandosi a una maggiore frequenza di cellule doppio-positive K8+/K5+. Ciò è stato accompagnato da un incremento dell'attività CSC e dei trascritti relativi ai bersagli delle vie di segnalazione canoniche Wnt e Notch, nonché a marcatori di attività staminale e della transizione epitelio-mesenchimale (EMT). L'analisi dell'attività CSC mediante saggi di formazione di tumorosfere *in vitro* ha rivelato che l'ICI stimolava l'auto-rinnovamento delle CSC ed era in grado di superare l'inibizione delle vie Wnt e Notch se attuate singolarmente, ma non quando combinate; ciò indica che tali vie di segnalazione possono compensarsi a vicenda. I nostri studi dimostrano che i carcinomi mammari ER α ⁺ a lignaggio misto contengono cellule tumorali altamente plastiche ed evidenziano come i segnali estrogenici costituiscano una componente di una rete paracrina che mantiene l'equilibrio tra i lignaggi, indipendentemente dagli effetti sulla crescita cellulare. I nostri risultati suggeriscono che l'impiego di terapie anti-estrogeniche nel sottogruppo di tumori clinici qui modellizzato potrebbe non solo fallire nel rallentare la crescita neoplastica, ma anche favorire una crescita più aggressiva delle CSC mammarie plastiche.

Materiali e Metodi (riassunto)

Gli approcci sperimentali utilizzati per valutare gli effetti dei trattamenti antiestrogenici nel modello murino NRL-PRL sono i seguenti.

Per lo studio in vivo, i topi portatori di tumore mammario indotto da prolattina sono stati trattati mediante iniezioni sottocutanee di Fulvestrant, monitorando regolarmente la progressione tumorale e raccogliendo i tessuti dopo due e quattordici giorni.

Successivamente, i tumori espiantati sono stati sottoposti a digestione enzimatica e separazione cellulare tramite citofluorimetria a flusso basata sui marcatori EpCAM e CD49f, permettendo di isolare e analizzare distintamente le popolazioni cellulari luminali e basali.

Le cellule così ottenute sono state impiegate in saggi di coltura in vitro per quantificare la frequenza delle cellule staminali tumorali e valutarne la capacità di autorinnovamento attraverso generazioni successive di tumorsfere, esponendole a Fulvestrant, Tamoxifene o inibitori molecolari delle vie di segnalazione Wnt e Notch.

La caratterizzazione molecolare e tissutale è stata completata attraverso analisi immunoistochimiche e di immunofluorescenza per stimare proliferazione, apoptosi ed espressione delle citocheratine K8 e K5, affiancate da reazioni di RT-qPCR per quantificare i livelli trascrizionali dei geni bersaglio associati a staminalità, transizione epitelio-mesenchimale e percorsi di trasduzione del segnale.

Risultati (riassunto e semplificato)

I topi NRL-PRL sviluppano spontaneamente adenocarcinomi ER α + istologicamente eterogenei, contenenti distinte sottopopolazioni epiteliali luminali e basali.

I topi femmina nullipare NRL-PRL sviluppano spontaneamente adenocarcinomi mammari aggressivi ER α + in risposta a un'elevata esposizione locale alla prolattina. Questi tumori possono essere trapiantati serialmente in ospiti singenici mantenendo inalterati sia l'istotipo sia l'espressione del recettore ER α . Le caratteristiche istologiche e molecolari dei tumori al seno spontanei che si sviluppano nei topi transgenici NRL-PRL a causa dell'elevata esposizione locale alla prolattina vengono descritte. I ricercatori hanno analizzato due carcinomi indipendenti (Tumore 1 e Tumore 2), rilevando che entrambi esprimono il recettore dell'estrogeno (ER α +) e bassi livelli di recettore del progesterone, mantenendo queste proprietà anche dopo passaggi seriali in vivo. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato che questi tumori sono costituiti da due sottopopolazioni epiteliali distinte, una **luminale** ed una **basale**, le cui proporzioni rimangono costanti nei vari passaggi. Questa eterogeneità di lignaggio, confermata dall'espressione differenziale delle citocheratine K8 (luminale) e K5 (basale), rispecchia quanto riscontrato in un sottogruppo di tumori clinici umani ER α + ad alto grado, rendendo il modello NRL-PRL un valido sistema per studiare l'eterogeneità tumorale.

La frequenza delle CSC è simile tra le sottopopolazioni luminali e basali.

Per verificare l'effettiva capacità di avvio tumorale (*cancer stem cell*, CSC) nelle due sottopopolazioni identificate, i ricercatori hanno isolato mediante FACS le cellule luminali e basali purificate e le hanno trapiantate a dosi scalari nei cuscinetti adiposi mammari di topi riceventi. Sebbene la frequenza globale di CSC differisse tra i due tumori analizzati (coerentemente con i diversi tempi di ricrescita del Tumore 1 rispetto al Tumore 2), all'interno dello stesso tumore la frequenza di CSC è risultata del tutto simile tra la frazione luminale e quella basale. I tumori secondari generati dal trapianto di sole cellule luminali o di sole cellule basali hanno mostrato la stessa architettura istologica, l'espressione di ER α e la medesima coesistenza di sottopopolazioni luminali e basali del tumore primario di partenza. Questa capacità di riprodurre l'intera eterogeneità tumorale originale è la proprietà cardine che definisce le cellule staminali tumorali.

Il trattamento in vivo con ICI 182,780 (fulvestrant) non altera la crescita tumorale, ma riduce transitoriamente le cellule basali e le CSC, attivando al contempo vie compensatorie che ripristinano l'eterogeneità e incrementano l'attività delle CSC.

Il trattamento in vivo con il farmaco non ha provocato una riduzione della massa tumorale né ha modificato la proliferazione cellulare o i livelli di apoptosi. Tuttavia, l'analisi temporale ha mostrato una risposta dinamica dei tessuti: a due giorni dall'inizio della somministrazione, si è verificata una riduzione temporanea superiore al cinquanta per cento della frazione di cellule basali, accompagnata da una contrazione dell'attività delle cellule staminali tumorali e da un calo dei segnali canonici della via Wnt.

Dopo quattordici giorni di trattamento continuativo, l'eterogeneità di lignaggio è stata completamente ripristinata e l'attività delle cellule staminali tumorali è recuperata o aumentata. Questo ripristino si è associato a un incremento delle cellule doppiamente positive per le citocheratine K8 e K5, a una marcata attivazione della via di segnalazione Notch e all'aumento dell'espressione di geni legati alla staminalità e alla transizione epitelio-mesenchimale. Il blocco del recettore dell'estrogeno indotto dal Fulvestrant innesca quindi meccanismi compensatori vicarianti che consentono al tumore di riadattarsi, aumentare la propria plasticità cellulare e riattivare la componente staminale.

Il trattamento antiestrogenico in vitro aumenta l'autorinnovamento delle tumorsfere

Con studi in vitro, i ricercatori approfondiscono l'effetto diretto del farmaco fulvestrant sulle cellule staminali tumorali (CSC) al di fuori della complessità del microambiente in vivo.

Il trattamento diretto in vitro con l'antiestrogeno ICI 182,780 o con 17 β -estradiolo (E2) durante la crescita delle tumorsfere primarie non modifica il numero o le dimensioni degli sferoidi formati. Questo indica che l'antiestrogeno non elimina direttamente le CSC già presenti e non agisce semplicemente selezionando le cellule differenziate.

Quando le tumorsfere primarie vengono dissociate e ripiastrate in assenza di farmaco, le cellule precedentemente trattate con ICI 182,780 (così come quelle trattate con tamoxifene) generano un numero significativamente superiore di tumorsfere secondarie. Ciò evidenzia che il blocco del recettore degli estrogeni stimola direttamente la capacità di autorinnovamento (*self-renewal*) delle CSC.

Anche in questo sistema isolato in vitro, ICI 182,780 (fulvestrant) provoca un aumento significativo della proporzione di cellule **K8+/K5+** (dal ~19% al ~28%), dimostrando che l'antiestrogeno riprogramma il destino e la plasticità delle cellule tumorali in modo diretto.

L'aumento dell'autorinnovamento è legato in modo specifico al blocco dei recettori ER α : non viene replicato né dall'inibizione dei recettori del progesterone/glucocorticoidi (RU486), né dal blocco del recettore della prolattina (D1-9-G129R-hPRL), né dall'antagonista del recettore di membrana GPER (G-36).

Per chiarire quali vie di segnalazione mediano la risposta al Fulvestrant, sono stati impiegati diversi inibitori specifici. Sebbene il blocco della via Wnt tramite l'inibitore iCRT14 o della via Notch tramite l'inibitore della gamma-secretasi GSI riduca l'autorinnovamento basale, la somministrazione contemporanea di Fulvestrant è in grado di superare l'inibizione di ciascuna via presa singolarmente. Tuttavia, quando iCRT14 e GSI vengono combinati insieme, il Fulvestrant perde la capacità di stimolare l'autorinnovamento, dimostrando che le due vie agiscono in modo complementare. Infine, l'aumento dell'autorinnovamento indotto dal Fulvestrant è stato bloccato dall'inibitore delle istone deacetilasi Tricostatina A, mentre la somministrazione di inibitori specifici per EGFR, chinasi della famiglia SRC, mTOR, FAK e JAK2 non ha alterato la capacità di autorinnovamento con o senza Fulvestrant.

In sintesi: il fulvestrant e il tamoxifene vengono impiegati come agenti antiestrogenici per valutare la risposta e gli adattamenti molecolari delle cellule tumorali nel carcinoma mammario ERa+ indotto da prolattina. Il fulvestrant rappresenta il farmaco principale della ricerca ed è stato testato sia in vivo sia in vitro; sebbene in vivo non influisca direttamente sul tasso di proliferazione o sul

volume del tumore, innesca a lungo termine una risposta compensatoria che aumenta la plasticità cellulare, arricchisce la frazione di cellule staminali tumorali e attiva le vie di segnalazione Wnt e Notch. Il tamoxifene è stato invece impiegato esclusivamente nei saggi in vitro di tumorsfere come controllo comparativo per verificare se tali dinamiche fossero legate al blocco dei recettori estrogenici in generale. I risultati hanno confermato che anche il tamoxifene, in modo analogo al fulvestrant, promuove l'autorinnovamento delle cellule staminali tumorali, dimostrando che l'inibizione dell'asse estrogenico in questo specifico modello non arresta la malattia ma favorisce una riprogrammazione adattativa del tumore.

Discussione (riassunta e semplificata)

I tumori mammari ER α + indotti da prolattina rappresentano un modello di tumore aggressivo caratterizzato da una marcata eterogeneità cellulare, composta da sottopopolazioni con marcatori luminali e basali. A differenza della ghiandola mammaria sana, in cui le cellule staminali risiedono esclusivamente nel comparto basale, in questo modello l'attività delle cellule staminali tumorali è distribuita in modo equivalente tra la frazione luminale e quella basale. La straordinaria stabilità della proporzione tra le due popolazioni cellulari suggerisce l'esistenza di un equilibrio regolato da segnali paracrini e di contatto.

Il trattamento con l'antiestrogeno fulvestrant i(ICI 182,780) non rallenta la crescita della massa tumorale né la proliferazione cellulare, ma altera le dinamiche interne del tumore. La deplezione iniziale delle cellule basali e delle cellule staminali tumorali è associata alla riduzione del segnale Wnt4 di origine luminale. Tuttavia, il prosieguo della terapia attiva una risposta adattativa: aumenta la proporzione di cellule plastiche doppio-positive K8+/K5+ e vengono ripristinate sia l'eterogeneità di lignaggio sia l'attività delle cellule staminali. Questo recupero è sostenuto dalla riattivazione della via canonica Wnt, dal forte incremento della via Notch e dall'aumento dei marcatori di staminalità e transizione epitelio-mesenchimale come Sox2, Bmi1 e Twist1.

Gli esperimenti condotti in vitro dimostrano che l'antiestrogeno agisce direttamente stimolando l'autorinnovamento delle cellule staminali tumorali e aumentando la plasticità cellulare, anziché selezionare passivamente le cellule staminali eliminando quelle differenziate. Inoltre, l'effetto dell'antiestrogeno sull'autorinnovamento riesce a superare il blocco singolo delle vie Wnt o Notch, ma viene completamente soppresso solo quando entrambe le vie vengono inibite contemporaneamente, dimostrando la loro azione vicariante e complementare.

Dal punto di vista clinico, molte pazienti con tumori ER α + sviluppano resistenza o recidive dopo la terapia endocrina con tamoxifene o fulvestrant, farmaci che agiscono direttamente sul recettore degli estrogeni. Lo studio suggerisce che la presenza di prolattina e l'eterogeneità di lignaggio identificano un sottogruppo di tumori per i quali la sola terapia antiestrogenica potrebbe rivelarsi inefficace o persino controproducente, favorendo un fenotipo tumorale più rigenerativo e aggressivo.